

**KARAKTERISASI BERAT MOLEKUL PROTEIN HASIL FRAKSINASI
ENZIM SELULASE DARI *CANDIDA UTILIS***



Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Meraih Gelar Sarjana Sains
Jurusan Kimia Pada Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar

Oleh:
KASMAWATI
NIM : 60500113025

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI ALAUDDIN
MAKASSAR**

2017

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Mahasiswa yang bertanda tangan di bawah ini:

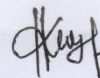
Nama : Kasmawati
NIM : 60500113025
Tempat/Tgl. Lahir : Bantaeng, 16 November 1996
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Alamat : Jl. Balana 1 Lr. 1 No. 7 Kel. Barana Kec. Makassar
Judul : Karakterisasi Berat Molekul Protein Hasil Fraksinasi Enzim
Selulase dari *Candida utilis*

Menyatakan dengan sesungguhnya dan penuh kesadaran bahwa skripsi ini benar adalah hasil karya sendiri. Jika dikemudian hari terbukti bahwa skripsi merupakan duplikat, tiruan, plagiat atau dibuat oleh orang lain, sebagian atau seluruhnya, maka skripsi dan gelar yang diperoleh karenanya batal demi hukum.

ALA UDDIN
MAKASSAR

Gowa, Agustus 2017

Penyusun



Kasmawati
NIM: 60500113025

PENGESAHAN SKRIPSI

Skripsi yang berjudul “**Karakterisasi Berat Molekul Protein Hasil Fraksinasi Enzim Selulase dari *Candida utilis***” yang disusun oleh **Kasmawati**, NIM : **60500113025** mahasiswa jurusan Kimia pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, telah diuji dan dipertahankan dalam sidang munaqasyah yang diselenggarakan pada hari rabu 23 Agustus 2017 bertepatan 1 Dzulhijjahh 1438 H, dinyatakan telah dapat diterima sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana dalam Ilmu Kimia, jurusan Kimia (dengan beberapa perbaikan).

Samata-Gowa, 23 Agustus 2017

1 Dzulhijjah 1438 H

DEWAN PENGUJI :

Ketua	: Dr. Wasilah, S.T., M.T	(.....)
Sekretaris	: H. Asri Saleh, ST., M.Si	(.....)
Munaqisy I	: Sjamsiah, S.Si., M.Si., Ph.D	(.....)
Munaqisy II	: Dra. Sitti Chadijah, M.Si	(.....)
Munaqisy III	: Dr. Tasmin Tangngareng, M.Ag	(.....)
Pembimbing I	: Dr. Maswati Baharuddin, M.Si	(.....)
Pembimbing II	: Sappewali, S.Pd., M.Si	(.....)

Diketahui oleh :
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar



Prof. Dr. H. Arifuddin, M.Ag
NIP : 19691205 199303 1 001

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Puji dan syukur bagi Allah swt tuhan semesta alam, atas rahmat, rahman dan rahim-Nya yang telah membimbing penulis sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul **“Karakterisasi Berat Molekul Protein Hasil Fraksinasi Enzim Selulase Dari *Candida utilis* ”** dan shalawat serta salam selalu terurai kepada baginda Nabi besar Muhammad saw, beserta para sahabat, keluarga, dan pengikutnya yang selalu istiqomah hingga akhir zaman.

Proses penyelesaian skripsi ini tidak terlepas dari bantuan banyak pihak, sehingga pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati dan penuh rasa hormat penulis menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya bagi semua pihak yang telah memberikan bantuan moril maupun materil baik langsung maupun tidak langsung. Terutama kepada kedua orang tua saya bapak Saharuddin dan ibu Suharni serta saudariku (Mita, Mutmainna dan Mutia) yang senantiasa mendoakan penulis, dan beserta orang-orang yang saya hormati:

1. Bapak Prof. Dr. H. Musafir Pababbari, M.Si selaku Rektor UIN Alauddin Makassar beserta seajarannya.
2. Bapak Prof. Dr. H. Arifuddin, M.Ag selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar beserta seajarannya.
3. Ibu Sjamsiah, M.Si., Ph.D selaku ketua Jurusan Kimia dan juga sebagai dosen penguji I yang senantiasa memberikan kritik dan saran guna menyempurnakan skripsi ini.
4. Ibu Aisyah, S.Si., M.Si selaku Sekretaris jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi.

5. Ibu Dr. Maswati Baharuddin, S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing I dan Bapak Sappewali, S.Pd., M.Si selaku dosen pembimbing II atas kesediaan dan keikhlasannya dalam membimbing penulis sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
6. Ibu Dra. Sitti Chadijah, M.Si selaku dosen penguji II dan Bapak Tasmin Tangngareng, M.Ag selaku dosen penguji III yang senantiasa memberikan kritik dan saran guna menyempurnakan skripsi ini.
7. Seluruh staf pengajar Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, khususnya staf pengajar Jurusan Kimia.
8. Seluruh laboran Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar. Terkhusus Kak Fitria Aziz, S.Si., S.Pd.
9. Teman seperjuangan penelitian di Laboratorium Biokimia (Nurul Azizah, Nada Pertiwi P, Nabila Aliyah Idris, Asrianti, Sari Bulan, Ika Prestianti, Hartini Syukrianto, dan Sukarno).
10. Sahabat Seperjuangan (Moh. Ikhsanuddin DG M, Chaerul Umam Adam, Miftahul Jannah, Fitriyani Najamuddin, Selvia, Sri Wahyuni, Yuliana Fahnur dan Kasmawati).
11. Seluruh teman Jurusan Kimia angkatan 2013 dan kakak angkatan 2012 beserta adik-adik angkatan 2014, 2015 dan 2016.
12. Seluruh teman KKN angkatan 55 Desa Rajang Kab. Pinrang.

Dan ucapan terima kasih kepada keluarga, rekan dan semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu. Semoga Allah swt membalas semua kebaikan kalian. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun.

Akhir kata, semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat kepada kita semua dan semoga segala aktifitas keseharian kita ternilai ibadah oleh Allah swt.

Wassalamu alaikum Wr. Wb

Samata-Gowa, Agustus 2017

Penulis,



DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
ABSTRAK.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1-5
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	5
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6-21
A. Tinjauan Umum Khamir.....	6-7
B. Candida.....	7-9
C. Enzim Selulase dan Selulosa.....	9-12
D. Protein	12-15
E. Tahapan Pemurnian Protein	15-17
F. Elektroforesis	17-21

BAB III METODOLOGI PENELITIAN	22-26
A. Waktu dan Tempat	22
B. Alat dan Bahan	22
1. Alat	23
2. Bahan	23
C. Prosedur Kerja.....	23-26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	27-38
A. Hasil Penelitian.....	27-30
1. Hasil Dialisis.....	27
2. Hasil Kromatografi Filtrasi Gel	28
3. Hasil Penentuan Kadar Protein	28
4. Hasil Pengujian Aktivitas Enzim	29
5. Hasil Penentuan Berat Molekul dengan Elektroforesis	30
B. Pembahasan.....	31-38
1. Hasil Dialisis.....	31
2. Hasil Kromatografi Filtrasi Gel	32
3. Hasil Penentuan Kadar Protein	34
4. Hasil Pengujian Aktivitas Enzim	35
5. Hasil Penentuan Berat Molekul dengan Elektroforesis	36-38
BAB V PENUTUP	39-39
A. Kesimpulan.....	39
B. Saran.....	39
DAFTAR PUSTAKA	40-43
LAMPIRAN-LAMPIRAN.....	43-67
RIWAYAT HIDUP PENULIS	

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Komposisi <i>Stacking</i> SDS PAGE	26
Tabel 4.1	Hasil Penentuan Kadar Protein	28
Tabel 4.2	Hasil Pengukuran Aktivitas Enzim.....	29
Tabel 4.3	Hasil <i>Running</i> elektroforesis Endapan Ekstrak Kasar	30
Tabel 4.4	Hasil <i>Running</i> elektroforesis Endapan Fraksinasi 80 %.....	30



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2	Seperangkat Alat Elektroforesis.....	20
Gambar 4.1	Hasil Dialisis Enzim Selulase	27
Gambar 4.2	Fraksi-fraksi Hasil Pemurnian Filtrasi GeL	33
Gambar 4.3	Hasil Elektroforesis	37



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Skema Penelitian.....	43
Lampiran 2	Skema Kerja.....	44
Lampiran 3	Hasil Kromatografi.....	49
Lampiran 4	Penentuan Kadar Protein.....	51
Lampiran 5	Penentuan Kurva Standar Aktivitas Enzim	53
Lampiran 6	Perhitungan Aktivitas Enzim	56
Lampiran 7	Perhitungan Pembuatan Larutan Standar.....	59
Lampiran 8	Penentuan Berat Molekul Protein	61
Lampiran 9	Dokumentasi Penelitian.....	63



ABSTRAK

Nama : Kasmawati

NIM : 60500113025

Judul : "Karakterisasi Berat Molekul Protein Hasil Fraksinasi Enzim Selulase dari *Candida utilis*"

Khamir memiliki daya selulolitik untuk menghasilkan enzim selulase. Enzim selulase juga merupakan salah satu jenis protein. Jenis protein yang dihasilkan dari khamir tersebut yaitu protein sel tunggal (PST). Khamir yang mampu menghasilkan enzim selulase yaitu *Candida utilis*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil berat molekul dari hasil fraksinasi enzim selulase yang berasal dari *Candida utilis* dengan menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*). Pemurnian dilakukan dengan penambahan amonium sulfat, dialisis, dan kromatografi filtrasi gel. Selanjutnya hasil dari kromatografi di uji kadar protein dan aktivitasnya. Aktivitas tertinggi akan ditentukan berat molekulnya dengan metode SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan pada endapan ekstrak kasar menghasilkan 4 pita protein yang memiliki berat molekul berturut-turut yaitu 61,67 KDa; 49,67 KDa; 28,92 KDa; dan 20,90 KDa. Sedangkan endapan hasil fraksinasi 80% diperoleh 3 pita yang memiliki berat molekul berturut-turut yaitu 95,87 KDa; 76,57 KDa; dan 61,67 KDa.

Kata kunci: *Candida utilis*, enzim selulase, SDS-PAGE.

ABSTRACT

Name : Kasmawati

NIM : 60500113025

**Title : "Characterization of Molecular Weight Results of Protein Fractionation
of Celulase Enzyme from Candida utilis"**

Khamir has cellulolytic power to produce cellulase enzymes. Cellulase enzyme is also one type of protein, the type of protein produced from the yeast is a single cell protein (PST). The yeast capable of producing cellulase enzyme is *Candida utilis*. This study aims to determine the weight of molecular fractionation of cellulase enzyme derived from *Candida utilis* by using SDS-PAGE method (Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis). Purification is carried out by adding ammonium sulfate, dialysis, and gel filtration chromatography. Furthermore, the results of chromatography will be tested in the proteint test levels and activities. The highest activity will be determined molecular weight by SDS-PAGE method. The results showed that the precipitate of crude extract yielded four protein bands having molecular weight of 61,67 KDa; 49.67 KDa; 28.92 KDa; And 20.90 KDa. Meanwhile, 80% fractionation fraction obtained 3 bands having molecular weight of 95,87 KDa; 76.57 KDa; And 61.67 KDa.

Keywords: *Candida utilis*, cellulase enzyme, SDS-PAGE.

ALAUDDIN
M A K A S S A R

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Perkembangan industri berbasis hayati yang banyak memanfaatkan mikroorganisme seperti bakteri, kapang dan khamir terus ditingkatkan diberbagai negara. Mikroorganisme merupakan salah satu sumber penghasil enzim yang memiliki nilai ekonomi penting dan banyak digunakan dalam industri sekarang ini. Oleh karena itu pencarian mikroba yang mampu menghasilkan enzim-enzim komersial perlu diupayakan Penelitian tentang pemanfaatan enzim sangat menarik perhatian karena berkaitan erat dengan pengembangan dibidang industri.

Banyak produk industri yang dihasilkan oleh mikroba yang aplikasinya sangat luas. Ditinjau dari produk industri yang dihasilkan mikroba, ada beberapa kelompok yaitu produk biokonversi (enzim). Enzim merupakan suatu kelas protein yang berfungsi sebagai katalis, agen kimiawi yang mempercepat laju suatu reaksi tetapi tidak ikut bereaksi Enzim terdapat pada sel-sel tumbuhan, fungi, bakteri, dan hewan. Enzim memiliki sifat-sifat spesifik yang menguntungkan yaitu efisien, selektif, dapat diprediksi, reaksi tanpa produk samping, dan ramah lingkungan. (Fitriyani, dkk, 2013). Salah satu enzim yang dapat dihasilkan dari mikroorganisme yaitu enzim selulase. Dimana enzim selulase ini termasuk enzim ekstraseluler, yang bersifat merubah sejenis bahan menjadi bahan baru yang lain. Karena kemampuan inilah enzim ekstraseluler banyak digunakan dalam pengolahan limbah, industri kertas, textil industri makanan dan minuman (Umniyatie, 2015). Mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim selulase salah satunya yaitu khamir.

Khamir termasuk salah satu jenis mikroorganisme yang memegang peranan penting dalam hidrolisis senyawa polisakarida (selulosa). Selulosa di alam jarang terdapat dalam bentuk murni, tetapi membentuk kristal bersama lignin dan hemiselulosa (Sonia, dkk, 2015). Selulosa ini adalah hasil hidrolisis dari enzim selulase. Enzim selulase juga merupakan salah satu jenis protein, jenis protein yang dihasilkan dari khamir tersebut yaitu protein sel tunggal (PST).

PST termasuk istilah yang digunakan untuk protein yang berasal dari mikroba sederhana bersel satu atau banyak seperti bakteri, jamur dan khamir. Istilah ini juga digunakan bagi protein mikroba untuk membedakannya dari protein hewan dan multiseluler. Sel-sel mikroba juga mengandung lemak, karbohidrat, vitamin, serta mineral, oleh karena itu selain sebagai pakan ternak, PST lebih juga dapat digunakan sebagai makanan manusia (Fajarwati, 2002).

Allah menciptakan jasad-jasad renik di dunia ini sesuai dengan fungsinya masing-masing. Meskipun makhluk yang sangat kecil, tetapi mikroorganisme memiliki peranan penting bagi manusia terutama untuk meningkatkan produk pangan. Sebagaimana dengan firman Allah dalam QS Al-An'am /6: 145 sebagai berikut:

قُلْ لَا أَجِدُ فِي مَا أُوحِيَ إِلَيَّ مُحَرَّمًا عَلَى طَاعِمٍ يَطْعَمُهُ إِلَّا أَنْ يَكُونَ مَيْتَةً أَوْ دَمًا مَسْفُوحًا أَوْ لَحْمَ خِنْزِيرٍ فَإِنَّهُ رِجْسٌ أَوْ فِسْقًا أُهِلَّ لِغَيْرِ اللَّهِ بِهِ فَمَنْ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلَا عَادٍ فَإِنَّ رَبَّكَ غَفُورٌ رَحِيمٌ ١٤٥

Terjemahnya:

“Katakanlah: "Tiadalah aku peroleh dalam wahyu yang diwahyukan kepadaku, sesuatu yang diharamkan bagi orang yang hendak memakannya, kecuali kalau makanan itu bangkai, atau darah yang mengalir atau daging babi karena sesungguhnya semua itu kotor atau binatang yang disembelih atas nama selain Allah. Barangsiapa yang dalam keadaan terpaksa, sedang dia tidak menginginkannya dan tidak (pula) melampaui batas, maka sesungguhnya Tuhanmu Maha Pengampun lagi Maha Penyayang” (Kementrian Agama, 2002).

Menurut Ibnu Katsir dalam bukunya yang berjudul Tafsir Ibnu Katsir yang menjelaskan bahwa tidaklah aku peroleh dalam wahyu yang diwahyukan kepadaku sesuatu yang diharamkan bagi orang yang hendak memakannya, kecuali kalau makanan itu bangkai atau darah yang mengalir atau daging babi. Dan (dengan mengambil kulitnya tersebut) kalian tidaklah (dianggap) memakannya, (maka) hendaklah kalian menyamak kulitnya sehingga kalian dapat memanfaatkannya. Setelah itu ia mengutus utusan untuk mengambilnya, kemudian dia menguliti kulit domba itu dan menyamaknya dan darinya dibuat qirbah (tempat air/susu dari kulit) dan dimanfaatkannya sampai rusak (Katsir, 2002).

Ayat tersebut berkaitan dengan sumber makanan yang berasal dari jenis hewan darat yang halal, sehingga dijadikan sumber protein yang halal apabila disembelih atas nama Allah SWT sebagai rasa ungkapan syukur atas rezeki yang dianugerahkanNya dan mesti akan mendapatkan hikmah yang menyehatkan bagi tubuh dan kelangsungan hidup baik untuk diri maupun untuk keturunannya.

Sumber protein sel tunggal (PST) berasal dari spesies khamir *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida arborea*, dan *Candida utilis*. Sel khamir mengandung protein lebih tinggi dibandingkan kapang, kandungan asam nukleat lebih rendah dari bakteri, dan ukuran sel lebih besar dibandingkan bakteri sehingga lebih mudah dipanen untuk digunakan sebagai protein sel tunggal (PST) (Corin dan Tri, 2014). Sebagian spesies dari *Candida* ini tidak berbahaya seperti jenis *Candida utilis* yang merupakan salah satu jenis khamir yang memiliki daya selulolitik. Jenis *Candida* ini dikatakan memiliki daya selulolitik karena mikroorganisme tersebut menghasilkan enzim selulase. Untuk mendapatkan selulase murni dari hasil penelitian sebelumnya maka dilakukan tahap pemurnian.

Tahap pemurnian ekstrak kasar memiliki beberapa metode, antara lain dengan fraksinasi garam atau pelarut organik, sentrifugasi, dialisis dan pemisahan dengan kromatografi kolom. Pada penelitian ini ekstrak kasar dimurnikan menggunakan fraksinasi amonium sulfat. Hasil dari fraksinasi tersebut dilanjutkan ke tahap dialisis yang bertujuan untuk memisahkan partikel kecil dari partikel besar dengan menggunakan membran berdasarkan prinsip difusi. Protein enzim yang dihasilkan dari proses dialisis merupakan protein enzim yang terbebas dari ammonium sulfat. (Mayasari, 2016). Kemudian dimurnikan kembali dengan kromatografi filtrasi gel yang bertujuan untuk menghilangkan protein yang tidak diinginkan dan diperlukan. Setiap hasil dari dialisis dan kromatografi filtrasi gel dilakukan pengujian aktivitas, sehingga aktivitas yang terbaik akan di analisis dengan elektroforesis SDS – PAGE (Seftiono, 2008).

Elektroforesis termasuk salah satu alat yang digunakan untuk memisahkan fraksi-fraksi suatu campuran berdasarkan atas pergerakan partikel yang bermuatan dibawah pengaruh medan listrik (Saputra, 2014). Hal ini dibuktikan berdasarkan penelitian Oktavia (2014), menyatakan bahwa hasil bobot molekul enzim selulase yang terdapat pada kapang endofit adalah 217,96 kDa, 163,15 kDa, 129,41 kDa, dan 76,84 kDa. Adapun penelitian pendukung yang lainnya yaitu penelitian Chasanah, dkk (2013), yang menyatakan bahwa dari hasil SDS-PAGE terlihat bahwa ada 3 selulase yang terdapat pada bakteri PMP 0126Y dengan berat molekul 39 kDa, 30 kDa dan 14 kDa.

Berdasarkan pernyataan diatas, maka dilakukan penelitian mengenai karakterisasi berat molekul hasil fraksinasi protein enzim selulase dari *Candida utilis*.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, rumusan masalah dari penelitian ini adalah bagaimana karakrerisasi protein enzim selulase yang terdapat pada isolat *Candida utilis*?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakrerisasi protein enzim selulase yang terdapat pada isolat *Candida utilis*.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan pemahaman kepada penulis tentang karakterisasi protein yang terdapat pada *Candida utilis*.
2. Memberikan informasi kepada masyarakat terhadap protein dan berat molekul dari enzim selulase yang terdapat pada *Candida utilis*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Umum Khamir

Kelompok mikroorganisme yang banyak diteliti berkaitan dengan kemampuannya memfermentasi gula disebut khamir. Kemampuan khamir memfermentasi gula karena adanya sistem transpor untuk gula dan sistem enzim yang dapat menghidrolisis gula dengan akseptor elektron alternatif selain oksigen, pada kondisi anaerob (Gandjar dan Sjamsuridzal, 2006). Khamir dapat tumbuh optimal pada pH 4,0-4,5 (Fardiaz, 1992).

Khamir tumbuh dengan baik pada suasana aerob namun untuk khamir fermentatif dapat tumbuh pada suasana anaerob (Jutono, *dkk.*, 1972). Kadar gula yang optimal untuk pertumbuhan khamir adalah 10%, tapi kadar gula yang optimal untuk permulaan fermentasi adalah 16% (Said, 1987). Khamir tumbuh baik pada medium *Malt Extract Agar* (MEA) atau *Potato Dextro Agar* (PDA) (Gandjar dan Sjamsuridzal, 2006).

Selama proses fermentasi sel khamir menjalani tahap adaptasi pada lingkungan baru (fase lag), tahap pembelahan sel yang sangat aktif (fase log), dan tahap ‘istirahat’ atau menurunnya aktivitas sel (fase stasioner) (Gandjar dan Sjamsuridzal, 2006). Khamir dikenal memiliki rentang ekologi yang cukup luas dan mampu hidup pada daerah ekstrem serta umumnya banyak ditemukan pada lingkungan yang memiliki bahan organik tinggi (Kanti, 2004).

Khamir termasuk fungi uniseluler yang bersifat dimorfistik, yang artinya memiliki dua fase dalam siklus hidupnya, atau yang bergantung kepada keadaan

lingkungan. Dua fase yang dimaksud yaitu fase hifa (membentuk miselium) dan fase khamir (membentuk sel tunggal). Namun, khamir juga dapat membentuk hifa palsu (*pseudohypa*) yang tumbuh menjadi miselium palsu (*pseudomycelium*), dan adapula sejumlah khamir yang dapat membentuk miselium sejati, misalnya pada khamir *Trichosporon* sp. Pseudomiselium adalah sel-sel tunas khamir yang memanjang dan tidak melepaskan diri dari sel induknya, sehingga saling berhubungan membentuk rantai, misalnya *Candida* sp., *Candida utilis*., *Kluyveromyces* sp., dan *Pichia* sp. (Indrawati, 2006).

Khamir juga telah lama digunakan untuk proses industri seperti pada pembuatan minuman beralkohol, fermentasi tape, pembuatan makanan ternak, kosmetik, dan antibiotik. Di samping itu, hasil penelitian yang dilaporkan oleh Lansane et al., (1997) menunjukkan bahwa khamir di masa depan dapat dikembangkan sebagai “*renewable resources* ”, yang mampu memproduksi alkohol dari berbagai jenis karbohidrat yang berbeda (Kanti, 2003).

Khamir dapat berkembang biak dalam gula sederhana seperti glukosa, maupun gula kompleks disakarida yaitu sukrosa. Selain itu untuk menunjang kebutuhan hidup diperlukan oksigen, karbohidrat dan nitrogen. Pada uji fermentasi gula-gula mempunyai reaksi positif pada gula dekstrosa, galaktosa, sukrosa, maltosa, raffinosa, trehalosa, dan negatif pada gula laktosa (Ahmad, 2005).

B. *Candida*

Organisme penghasil protein sel tunggal dapat berasal dari mikroba yang berfotosintesis maupun yang tidak berfotosintesis. Protein sel tunggal dari mikroba yang berfotosintesis dapat diperoleh dari ganggang *porphyra*, *Chlorella*, *Scenedesmus* dan *Spirulina*, sedangkan protein sel tunggal dari mikroba tak berfotosintesis dapat

diperoleh dari bakteri (*Bacillus hydrogenomonas* dan *Methylomonas clara*), kapang (*Rhizopus* dan *Fusarium*), dan Khamir (*Saccharomyces*, *Rhodotorula* dan *Candida*) (Fajarwati, 2002).

Virulensi dan resistensi sebagian besar mikroorganisme patogen, termasuk *Candida*, ditentukan oleh kemampuannya membentuk biofilm. Komunitas biofilm memiliki karakter yang spesifik dan sifat fenotip yang unik. Dengan demikian, biofilm adalah bentuk patogen dari *Candida* (Anggarani, dkk, 2014).

Genus *Candida* dapat membentuk *pseudohifa* atau hifa sejati dengan sekelompok tunas sel atau dapat membentuk klamidospora, beberapa diantaranya dapat membentuk lapisan tipis dan menyebabkan kerusakan pada bahan makanan dan bersifat patogen. Beberapa spesies dari genus *Candida* dapat digunakan sebagai sumber protein sel tunggal diantaranya *C.millleri*, *C. Maltosa*, *C.typlytica*, dan *C.utilis* (Fajarwati, 2002).

Menurut Fajarwati, (2016) dalam Alexopoulus (1996), sistematika dari *Candida utilis* adalah sebagai berikut :

Filum	: <i>Ascomycota</i>
Kelas	: <i>Saccharomycetes</i>
Ordo	: <i>Saccharomycetales</i>
Keluarga	: <i>Saccharomycetaceae</i>
Jenis	: <i>Candida</i>
Spesies	: <i>Utilis</i>

Candida utilis merupakan salah satu jenis mikroba yang dapat digunakan sebagai penghasil protein sel tunggal. *C.utilis* mempunyai bentuk sel yang bervariasi, bulat, oval, silindris sampai lonjong. Reproduksi secara aseksual dengan pembentukan tunas, pembelahan atau kombinasi keduanya. *C.utilis* bersifat aerob, tidak membentuk

alkohol selama kondisi kultur aerob dan dapat memanfaatkan gula untuk membentuk bahan sel, serta dapat tumbuh pada suhu 25°C-37°C (Fajarwati, 2002).

C. utilis mampu mengasimilasi nitrat, dapat memfermentasi dan menggunakan sumber karbon dari glukosa, sukrosa dan merupakan spesies khamir yang bersifat oksidatif yang kuat yang tidak dapat melakukan fermentasi alkohol (Fardiaz, 2002). Khamir ini mengandung sejumlah protein yang berkualitas tinggi, karbohidrat dan lipid. Kualitas *Candida* ditunjukkannya oleh tingginya kandungan asam-asam amino esensial di dalam selnya, yaitu asam pantotenat dan riboflavin (Frazier dan Westhoff, 1983).

C. Enzim Selulase dan Selulosa

Enzim merupakan sekelompok protein yang mengatur dan menjalankan perubahan-perubahan kimia dalam sistem biologi. Enzim dapat dihasilkan dihasilkan oleh organ-organ pada hewan dan tanaman yang secara katalitik menjalankan berbagai reaksi, seperti hidrolisis, oksidasi, reduksi, isomerasi, adisi, transfer radikal, pemutusan rantai karbon (Supriyatna, 2015). Enzim juga merupakan biokatalisator yang mempunyai aktivitas katalitik yang jauh lebih besar daripada katalisator sintetik (Arjita, 2009).

Enzim berfungsi sebagai katalis untuk proses biokimia yang terjadi dalam sel maupun diluar sel. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat daripada reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis. Enzim dapat berfungsi sebagai katalis yang sangat efisien, di samping itu mempunyai derajat kekhasan yang tinggi. Enzim dapat menurunkan energi aktivitas suatu reaksi kimia. Reaksi kimia ada yang membutuhkan energi dan ada pula yang menghasilkan energi atau mengeluarkan energi. Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim antara lain seperti konsentrasi

enzim, konsentrasi substrat, suhu, pengaruh pH dan pengaruh inhibitor (Poedjiadi, 2012).

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH, karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi oleh pH. Perubahan pH yang tidak sesuai akan menyebabkan daerah katalitik dan konformasi enzim berubah (Anja, dkk, 2009). Perubahan pH juga menyebabkan perubahan tingkat ionisasi pada enzim. Sebagai protein enzim, tidak berbeda dengan protein lain yang berarti mekanisme kerjanya sangat dipengaruhi oleh pH. Jika pH terlalu rendah, maka enzim menjadi tidak aktif, demikian juga jika pH terlalu tinggi, kemungkinan akan menyebabkan denaturasi pada enzim. Enzim membutuhkan pH tertentu untuk menjalankan aktivitasnya. Setiap enzim membutuhkan pH yang berbeda-beda. Ada enzim yang dapat bekerja optimal pada pH tinggi dan ada pula yang bekerja optimal pada pH yang rendah. Jika pH terlalu tinggi atau terlalu rendah enzim akan mengalami denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim (Iche, 2008).

Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul-molekul zat yang bereaksi dan mempercepat proses reaksi. Peningkatan laju reaksi tersebut terjadi karena enzim menurunkan energi aktivasi dan mempermudah terjadinya reaksi, namun tidak ikut bereaksi. Enzim bekerja secara spesifik sehingga enzim yang digunakan harus sesuai dengan polisakarida yang akan dihidrolisis (Iche, 2008). Enzim yang mengkonversi selulosa menjadi glukosa adalah enzim selulase.

Enzim selulase adalah suatu sistem enzim yang terdiri atas tiga tipe enzim utama yaitu kompleks endo- β -1,4-glukanase (CMCase, Cx selulase endoselulase, atau carboxy methyl cellulase), kompleks ekso- β -1,4-glukanase (aviselase, selobiohidrolase, C1 selulase), dan β -1,4-glukosidase atau selobiase. Selanjutnya menurut Kulp 1984 dalam Dini dan Ifah, 2014 menambahkan bahwa enzim selulase

adalah enzim yang dapat menghidrolisis selulosa dengan memutus ikatan glikosidik β -1,4 dalam selulosa, selodektrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya menjadi gula sederhana atau glukosa.

Hidrolisis merupakan proses perombakan rantai selulosa, protein dan molekul lainnya menjadi asam amino dan gula sederhana atau glukosa. Hidrolisis dapat dilakukan dengan menggunakan asam dan secara enzimatik. Hidrolisis dengan menggunakan asam menggunakan energi yang besar, sehingga biaya yang dikeluarkan relatif mahal. Selain itu, hidrolisis menggunakan asam dapat mengakibatkan degradasi produk monosakarida yang dihasilkan lebih rendah. Sedangkan hidrolisis secara enzimatik akan berjalan efisien, sehingga produk monosakarida yang dihasilkan lebih tinggi (Ismatullahjay, 2014).

Interaksi antara enzim dengan substrat yang semakin lama menyebabkan semakin banyak glukosa yang terbentuk. Akan tetapi pada waktu hidrolisis tertentu konsentrasi glukosa akan mengalami penurunan. Penurunan ini disebabkan oleh adanya akumulasi produk yang telah terbentuk sebelumnya dan menyebabkan penghambatan bagi enzim selulase. Inhibitor enzim selulase berupa produk dari hidrolisis selulosa yaitu glukosa dan selobiosa. Selobiosa menghambat enzim eksoglukanase sedangkan glukosa menghambat enzim β -glukosidase (Kamila, 2003).

Enzim selulase memiliki peranan penting dalam bidang industri, diantaranya digunakan untuk proses bioremediasi, penanganan air limbah, pengolahan kopi, industri kertas, industri pakan ternak, produksi protein sel tunggal, produksi protoplas, teknik genetik dan sebagainya. Selain dalam bidang industri juga penting dalam bidang farmasetikal, seperti industri tekstil terutama dalam aplikasi deterjen untuk mengembalikan sifat-sifat tekstil yang berkaitan dengan selulosa, dan produksi biofuel dari biomassa berselulosa (Ariyani, dkk, 2014).

Selulosa adalah polimer β -glukosa dengan ikatan β -1,4 diantara satuan glukosanya. Selulosa berfungsi sebagai bahan struktur dalam jaringan tumbuhan dalam bentuk campuran polimer homolog dan biasanya disertai polisakarida lain dan lignin dalam jumlah yang beragam. Molekul selulosa memanjang dan kaku, meskipun dalam larutan. Gugus hidroksil yang menonjol dari rantai dapat membentuk ikatan hidrogen dengan mudah, mengakibatkan kekristalan dalam batas tertentu. Derajat kekristalan yang tinggi sehingga menyebabkan modulus kekenyalan sangat meningkat dan daya renggang serat selulosa menjadi lebih besar dan mengakibatkan makanan yang mengandung selulosa lebih liat (Sari, 2009).

Selulosa merupakan komponen lignoselulosa terbesar dan termasuk polisakarida yang melimpah di bumi. Hasil akhir dari degradasi selulosa meliputi glukosa, selobiosa, dan oligosakarida. Hidrolisis selulosa untuk menghasilkan glukosa sebagai produk utama dikatalisis oleh enzim selulase (Sinatari, dkk, 2013). Selulase bukanlah enzim tunggal tapi merupakan sistem enzim yang terdiri dari beberapa komponen enzim yang bekerja secara bertahap untuk menguraikan selulosa menjadi glukosa dengan komposisi yang beragam tergantung dari sumbernya (Anggarawati, 2012).

D. Protein

Istilah protein yang dikemukakan pertama kali oleh pakar kimia Belanda, G.J.Mulder pada tahun 1939, yang berasal dari bahasa Yunani “proteios” artinya yang pertama atau yang paling utama. Protein memegang peranan yang sangat penting pada organisme yaitu dalam struktur, fungsi dan reproduksi. Protein adalah suatu polipeptida yang mempunyai bobot molekul yang sangat bervariasi, dari 5000 hingga lebih dari satu juta. Disamping berat molekul yang berbeda-beda, protein mempunyai

sifat yang berbeda-beda pula. Ada protein yang mudah larut dalam air, tetapi ada juga yang sukar larut dalam air (Dewi, 2013).

Semua jenis protein terdiri dari rangkaian dan kombinasi dari 20 asam amino. Setiap jenis protein mempunyai jumlah dan urutan asam amino yang khas. Di dalam sel, protein juga terdapat pada membran plasma maupun membran internal yang menyusun organel sel seperti mitokondria, retikulum endoplasma, nukleus dan badan golgi dengan fungsi yang berbeda-beda tergantung pada tempatnya. Protein-protein yang terlibat dalam reaksi biokimia sebagian besar berupa enzim banyak terdapat di dalam sitoplasma dan sebagian terdapat pada kompartemen dari organel sel. (Subekti, 2012).

Penggolongan protein berdasarkan bentuk dan sifat fisik yaitu protein globular dan protein serabut. Protein berdasarkan fungsi biologi yaitu enzim, protein transport, protein nutrisi dan penyimpanan. Protein kontraktile, protein struktural, protein pertahanan dan protein pengatur. Protein berdasarkan daya larutnya yaitu albumin, globulin, gliadin, histon, protamin. Penggolongan protein majemuk merupakan protein yang mengandung senyawa bukan hanya protein, seperti: fosforprotein, kromoprotein, fosfolipid, protein koenzim, lipoprotein, metaloprotein, glikoprotein dan nukleoprotein (Subekti, 2014).

Menurut Dewi (2013), penggolongan protein berdasarkan strukturnya, protein dibentuk oleh: Struktur primer yang dibentuk oleh ikatan peptida antar asam amino. Struktur sekunder yang dibentuk oleh ikatan hidrogen intramolekular yang terjadi di antara oksigen karbonil dan nitrogen amida pada perangkat peptida. Struktur tersier, merupakan rangkaian molekuler yang menggambarkan bentuk keseluruhan dari protein. Struktur kuartener dibentuk oleh beberapa polipeptida yang berikatan satu sama lain tidak secara kovalen.

Pemanfaatan protein sel tunggal untuk manusia perlu diperhatikan, karena kandungan asam nukleatnya yang cukup tinggi, yaitu pada bakteri lebih dari 11,00 %, ganggang 4,0-6,0 %, kapang 2,5-6,0 %, dan kamir 6,0-11,0%. Tingkat maksimum yang boleh dikonsumsi dari asam nukleat adalah 2 gram per hari atau setara dengan konsumsi protein sel tunggal 30 gram per hari. Kandungan asam nukleat yang tinggi dalam khamir bila dikonsumsi lebih oleh manusia dapat membahayakan dan menyebabkan penyakit encok. Oleh karena itu protein sel tunggal khamir lebih tepat digunakan sebagai pakan ternak (Fajarwati, 2002).

Menurut Dewi (2013), protein memegang peranan penting dalam hampir semua proses biologi. Peran dan aktivitas protein terlihat pada contoh berikut pertama katalis enzimatik, yang hampir semua reaksi kimia dalam sistem biologi dikatalisis oleh makromolekul spesifik yang disebut enzim. Enzim mempunyai daya katalitik yang besar, umumnya meningkatkan kecepatan reaksi sampai jutaan kali. Fakta menunjukkan bahwa hampir semua enzim yang dikenal adalah protein. Jadi protein merupakan pusat dalam menetapkan pola transformasi kimia dalam sistem biologis. Kedua transport dan penyimpanan yang dibantu oleh protein spesifik. Ketiga koordinasi gerak, protein merupakan komponen utama dalam otot. Kontraksi otot berlangsung akibat pergeseran dua jenis filamen protein. Keempat penunjang mekanis, ketegangan kulit dan tulang disebabkan oleh kolagen yang merupakan protein fibrosa. Kelima Protein imun, sebagai antibodi merupakan protein yang sangat spesifik dan dapat mengenal serta berkombinasi dengan benda asing seperti virus, bakteri dan sel yang berasal dari organisme lain. Keenam membangkitkan dan menghantar impuls saraf yang diperantai oleh protein reseptor dan yang terakhir pengatur urutan ekspresi informasi genetik sangat penting bagi pertumbuhan yang beraturan serta diferensiasisel.

Protein lengkap yang mengandung semua jenis asam amino esensial, ditemukan dalam daging, ikan, unggas, keju, telur, susu, produk jenis quark, tumbuhan berbiji, suku polong-polongan, dan kentang. Protein tidak lengkap ditemukan dalam sayuran, padi-padian, dan polong-polongan (Subekti, 2012). Penggunaan protein sel tunggal memiliki beberapa keuntungan. Antara lain, kandungan proteinnya tinggi, peryumbuhan sel cepat karena waktu regenerasinya pendek, dan produksinya tidak bergantung iklim (Frazier dan Westhoff, 1983).

E. Tahap Pemurnian Protein

Pemurnian enzim adalah suatu proses memisahkan enzim yang diinginkan dari senyawa lain yang mengganggu. Pemurnian enzim berdasarkan sifat-sifat kelarutannya bergantung pada konsentrasi garam yang terlarut, polaritas pelarut, pH dan suhu (Arjita, 2009). Ada dua metode umum yang dapat digunakan untuk pemisahan enzim yaitu dengan penyaringan manual atau dengan sentrifugasi. Sentrifugasi merupakan tahap awal pemurnian enzim. Sentrifugasi akan menghasilkan supernatan yang jernih dan endapan yang terikat kuat pada dasar tabung yang kemudian dipisahkan secara normal. Pemurnian protein dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain perubahan pH, penambahan pelarut organik dan penambahan garam (Mayasari, 2016).

Penambahan garam merupakan proses pemurnian protein. Garam yang sering digunakan yaitu ammonium sulfat. Fraksi menggunakan ammonium sulfat menghasilkan protein yang mengandung kadar garam yang tinggi. Ammonium sulfat yang terkandung dalam protein dapat dihilangkan dengan cara dialisis enzim (Mayasari, 2016).

Dialisis merupakan proses transport solut melalui membran, dimana solut dipindahkan antara dua cairan. Pada proses dialisis terjadi perpindahan garam amonium sulfat yang mempunyai berat molekul rendah dari sampel berganti dengan larutan buffer dalam dialisat. Pada waktu garam bergerak melalui pori-pori membran, garam teradsorpsi pada permukaan membran dan selanjutnya bergerak dari sisi membran yang satu ke sisi membran yang lain (Mayasari, 2016).

Proses dialisis dilakukan pada suhu dingin untuk mencegah terjadinya kerusakan protein enzim yang dimurnikan. Prinsip dialisis adalah difusi, yaitu terjadinya perpindahan zat terlarut dari larutan berkonsentrasi tinggi ke larutan berkonsentrasi yang rendah. Konsentrasi buffer di luar membran selofan lebih rendah daripada konsentrasi bufer di dalam membran selofan sehingga amonium sulfat dapat berdifusi ke luar membran selofan dan terpisah dari selulase. Pada tahap dialisis juga terjadi proses pemisahan molekul berdasarkan ukuran melalui pori membran selofan. Pori ini memungkinkan molekul kecil, seperti pelarut, garam, dan metabolit kecil untuk berdifusi melintasi membran, sedangkan molekul yang lebih besar, seperti enzim akan tertahan di dalam membran selofan (Sinatari, dkk., 2013: 137).

Amonium sulfat akan bereaksi dengan BaCl_2 menghasilkan endapan putih BaSO_4 . Dialisis dihentikan saat penambahan BaCl_2 dalam larutan bufer tidak lagi menghasilkan endapan putih BaSO_4 , yang mengindikasikan bahwa tidak ada lagi amonium sulfat yang terkandung dalam fraksi enzim (Sinatari, dkk, 2013). Fraksi enzim yang diperoleh aktivitas tertinggi dilakukan pemurnian kembali dengan menggunakan kromatografi filtrasi gel.

Kromatografi filtrasi gel merupakan pemisahan molekul menurut ukuran molekulnya. Pemisahann akan berlangsung di dalam kolom yang berisi gel dalam

bentuk granula dan terdiri atas struktur tiga dimensi dari polimer yang berkaitan silang. Ikatan silang ini menghasilkan pori-pori dalam granula. Ukuran pori dipengaruhi oleh tingkatan ikatan silang, makin besar tingkatan ikatan silang makin kecil ukuran pori (Seftiono, 2008).

Komposisi dan pori-pori partikel gel saat diatur dengan memilih bahan dan kepekatan yang sesuai. Matriks yang sering digunakan yaitu Sephadex yang terdiri atas partikel kecil dari senyawa yang tidak larut, bersifat hidrofolik, stabil dan tidak dipengaruhi oleh basa dan asam lemah. Tetapi, asam kuat pekat harus dihindari karena dapat menghidrolisis ikatan glikosidik (Seftiono, 2008).

F. *Elektroforesis*

Pemisahan protein merupakan tahap yang harus dilakukan untuk mempelajari sifat dan fungsi protein. Protein dapat dipisahkan dari protein jenis lain atau dari molekul lain berdasarkan ukuran, kelarutan, muatan dan afinitas ikatan. Salah satu teknis yang digunakan untuk melihat profil protein dan menentukan bobot molekulnya menggunakan SDS-PAGE (Dewi, 2013).

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul selular berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Kecepatan gerak molekul tergantung pada nisbah (rasio) muatan terhadap massanya, serta tergantung pada bentuk molekulnya. Elektroforesis dapat digunakan untuk keperluan preparatif, selain bersifat analitik, bentuknya ada yang bersifat kolom, ada pula lempengan. Salah satu jenis elektroforesis adalah elektroforesis SDS-PAGE (Hidayat, 2011).

Salah satu metode PAGE yang umumnya digunakan untuk analisa campuran secara kualitatif adalah SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel*

Elctroforesis). Prinsip pengguaan metode ini adalah migrasi komponen akril amida. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Elektroforesis* (SDS-PAGE) adalah teknik untuk memisahkan rantai polipeptida pada protein berdasarkan kemampuannya untuk bergerak dalam arus listrik, yang merupakan fungsi dari panjang rantai polipeptida atau berat molekulnya. Hal ini dicapai dengan menambahkan deterjen SDS dan pemanasan untuk merusak struktur tiga dimensi pada protein dengan terpecahnya ikatan disulfide yang selanjutnya direduksi menjadi gugus sulfidhihidril (Saputra, 2014).

Metode ini sering digunakan untuk menentukan berat molekul suatu protein disamping untuk memonitor pemurnian protein. SDS-PAGE dilakukan terhadap protein tak larut dengan kekuatan ion rendah dan dapat menentukan apakah suatu protein termasuk monomerik atau oligomerik, menetapkan berat molekul dan jumlah rantai polipeptida sebagai subunit atau monomer (Anam, 2009).

Penggunaan SDS-PAGE bertujuan untuk memberikan muatan negatif pada protein yang akan dianalisa. Protein yang terdenaturasi sempurna akan mengikat SDS dalam jumlah yang setara dengan berat molekul tersebut. Denaturasi protein dilakukan dengan merebus sampel dalam buffer yang mengandung β -merkaptotanol (berfungsi untuk mereduksi ikatan disulfide), gliserol dan SDS. Muatan asli protein akan digantikan oleh muatan negatif dari anion yang terikat sehingga kompleks protein SDS memiliki rasio muatan per berat molekul yang konstan (Anam, 2009).

SDS adalah detergen anionik yang dapat melapisi protein, sebagian besar sebanding dengan berat molekulnya, dan memberikan muatan listrik negatif pada semua protein dalam sampel. Protein glikosilasi mungkin tidak bermigrasi, karena diharapkan migrasi protein lebih didasarkan pada berat molekul dan massa rantai polipeptidanya, bukan gula yang melekat. SDS mengubah semua molekul protein

kembali ke struktur primernya (struktur linear) dengan cara meregangkan gugus utama polipeptida. Selain itu, SDS juga menyelubungi setiap molekul protein dengan muatan negatif (Saputra, 2014).

Pada mekanisme SDS PAGE, protein bereaksi dengan SDS yang merupakan deterjan anionik membentuk kompleks yang bermuatan negatif. Protein akan terdenaturasi dan terlarut membentuk kompleks berikatan dengan SDS, berbentuk elpis atau batang dan berukuran sebanding dengan berat molekul protein. Protein dalam bentuk kompleks yang bermuatan negatif ini terpisahkan berdasarkan muatan dan ukurannya secara elektroforesis di dalam matriks gel poliakrilamid. Berat molekul protein dapat diukur dengan menggunakan protein standar yang telah diketahui berat molekulnya (Hidayat, 2011). Berikut gambar dari seperangkat alat elektroforesis:



Gambar 2.1: Seperangkat alat elektroforesis
Sumber: Hidayat (2011)

Poliakrilamid merupakan polimer dari monomer akrilamid. Saat poliakrilamid berbentuk gel, maka akan terbentuk pori-pori kecil yang membentuk labirin atau terowongan dan saluran yang memungkinkan molekul bergerak (migrasi). Sebagaimana dijelaskan melalui firman Allah SWT QS. An-Nisa/4: 100 sebagai berikut:

﴿وَمَنْ يُهَاجِرْ فِي سَبِيلِ اللَّهِ يَجِدْ فِي الْأَرْضِ مُرْغَمًا كَثِيرًا وَسَعَةً وَمَنْ يَخْرُجْ مِنْ بَيْتِهِ مُهَاجِرًا إِلَى اللَّهِ وَرَسُولِهِ ثُمَّ يُدْرِكْهُ الْمَوْتُ فَقَدْ وَقَعَ أَجْرُهُ عَلَى اللَّهِ وَكَانَ اللَّهُ غَفُورًا رَحِيمًا ١٠٠﴾

Terjemahnya:

“Barangsiapa berhijrah di jalan Allah, niscaya mereka mendapati di muka bumi ini tempat hijrah yang luas dan rezeki yang banyak. Barangsiapa keluar dari rumahnya dengan maksud berhijrah kepada Allah dan Rasul-Nya, kemudian kematian menimpanya (sebelum sampai ke tempat yang dituju), maka sungguh telah tetap pahalanya di sisi Allah. Dan adalah Allah Maha Pengampun lagi Maha Penyayang”(Kementrian Agama, 2002).

Menurut M.Quraish Shihab dalam bukunya yang berjudul Tafsir al-Mishbah menjelaskan bahwa siapa yang berhijrah, yakni meninggalkan apa yang diperintahkan Allah dan Rasulnya dan dilakukan di jalan Allah dengan rasa tulus, niscaya mereka akan menemukan tempat yang luas dan bebas dari tekanan serta mendapat tempat yang menyenangkan untuk melanjutkan hijrahnya. Walaupun dia tidak sampai ke tempat tujuan, tetapi dia pasti akan beruntung (Shihab, 2002).

Ayat tersebut berkaitan dengan prinsip dasar elektroforesis, yaitu memisahkan molekul-molekul protein berdasarkan kecepatan migrasi melewati gel elektroforesis. Pemisahan dilakukan terhadap campuran bahan dengan muatan listrik yang berbeda. Molekul-molekul tersebut diletakkan di dalam medan listrik sehingga akan bermigrasi karena adanya perbedaan muatan. Elektroforesis akan memisahkan makromolekul berdasarkan laju perpindahannya melewati suatu gel dibawah pengaruh medan listrik menjadi pita-pita yang masing-masing memiliki berat molekul.

Kunci untuk menentukan berat molekul yang akurat adalah memilih kondisi pemisahan yang menghasilkan hubungan linier antara logaritma dari berat molekul dan migrasi protein. Migrasi protein di dalam gel poliakrilamida terutama ditentukan oleh muatan molekul dan juga dipengaruhi oleh ukuran molekul. Protein yang

dipisahkan dengan SDS-PAGE dapat dikarakterisasi berdasarkan berat molekulnya dengan satuan Kilo Dalton (kDa). Satu dalton sama dengan satu hidrogen molekul (Rachmania, dkk, 2017).

Analisis menggunakan SDS-PAGE ini, gel poliakrilamid yang digunakan terdiri dari 2 yaitu *stacking gel* dan *resolving gel*. *Stacking gel* berfungsi sebagai gel tempat meletakkan sampel, terdapat beberapa *well*, sedangkan *resolving gel* merupakan tempat dimana protein akan bergerak/berpindah menuju anoda. *Stacking gel* dan *resolving gel* memiliki komposisi yang sama, yang membedakan hanya konsentrasi gel poliakrilamid pembentuknya, dimana konsentrasi *Stacking gel* lebih rendah daripada *resolving gel* (Saputra, 2014).

Sampel-sampel enzim yang diinjeksi ke dalam sumur gel diberi warna dengan bromphenol biru yang dapat terionisasi. Fungsi pewarna adalah untuk membantu memonitor jalannya elektroforesis. Berat molekul protein dapat diketahui dengan membandingkan Rf protein dengan protein standar yang berat molekulnya telah diketahui (Anam, 2009).

Menurut Dewi (2013), kegunaan elektroforesis antara lain, menentukan berat molekul, dapat mendeteksi terjadinya pemalsuan bahan, dapat mendeteksi terjadinya kerusakan bahan seperti protein dan pengolahan dan penyimpanan, untuk memisahkan spesies molekul yang berbeda secara kualitatif maupun kuantitatif, yang selanjutnya masing-masing spesies dapat dianalisis dan menetapkan titik isoelektrik protein.

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dilaboratorium Biokimia Jurusan Kimia UIN Alauddin Makassar, waktu penelitian ini berlangsung dari bulan November 2016 sampai Juni 2017.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat elektroforesis Bio-Rad, UV-Vis, *sentrifuge* Heraeus, kolom kromatografi, lemari pendingin Sharp, mikropipet Bio-Rad, neraca analitik, oven, *water bath shaker*, penangas, botol steril, cawan petri, erlenmeyer 250 mL dan 50 mL, gelas kimia 500 mL, 250 mL, 100mL, dan 50 mL, tabung reaksi, tabung eppendof, botol vial, pipet tetes pembakar spiritus, pinset, ose bulat, sendok stainless steel.

2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu Aquabidest, Aquadest, Aluminium Foil, *Candida Utilis*, substrat avisel, *Dinitro Salisilic Acid* (DNS), Marker *Jena Bioscience*, Amonium Sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), Barium Klorida (BaCl_2), Saran Wrap, Larutan Buffer Fosfat 0,05 M pH 7, Larutan Buffer Fosfat 0,02 M pH 7, Matriks Sephadex G-75, Buffer Elektroforesis, 10% SDS-gel poliakrilamida, Amonium Per Sulfat (APS) 10%, Asam Asetat Glisial (CH_3COOH), Coomasie Brilliant Blue R-250, Glisin, Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), Metanol (CH_3OH), Asam Phospat (H_3PO_4) 85 %, SDS (Sodium

Dedocyl Sulfat), Tris HCl, Kertas Saring Whatman No.41, Kertas pH Universal, dan *tissue*.

C. Prosedur Kerja

1. Pemurnian Enzim Selulase

a. Dialisis

Dialisis enzim selulase menggunakan saran wrap. Saran wrap yang berisi enzim direndam dalam bufer natrium fosfat 0,05 M pH 7 lalu diaduk dengan pengaduk *magnetic stirer* dalam keadaan dingin. Larutan bufer fosfat 0,05 M pH 7 ditambahkan BaCl₂ tiap 1 jam, jika terbentuk endapan putih maka larutan bufer harus diganti dengan larutan bufer yang baru. Penggantian larutan bufer dilakukan hingga saat penambahan BaCl₂ tidak terbentuk endapan putih. Perlakuan tersebut diterapkan pada tiap-tiap fraksi selulase untuk mendapatkan selulase yang bebas amonium sulfat. Setelah didapatkan fraksi protein, selanjutnya dimurnikan kembali dengan menggunakan kromatografi filtrasi gel untuk memisahkan jenis protein.

b. Kromatografi filtrasi gel

Matriks Sephadex G-75 ditimbang sebanyak 2 gram, dilarutkan dalam aquabides, divacum selama 6 jam, dibiarkan selama semalam dalam kulkas. Setelah itu matriks Sephadex G-75 dimasukkan secara perlahan ke dalam kolom kromatografi yang berdiameter 1 cm dan tinggi 60 cm. Volume enzim selulase yang dimurnikan sebanyak 30 ml. Matriks G-75 dielusi dengan 0,02 M buffer fosfat pH 7,0. Volume fraksi yang ditampung masing-masing sebanyak 5 ml. Fraksi eluen ditampung dalam botol vial dan aktivitas selulase setiap fraksi diukur dengan metode DNS (Seftiono, 2008).

2. Penentuan Kadar Protein dengan cara *Optical Density* (OD)

Penentuan kadar protein menggunakan metode kekeruhan (OD) dengan cara mengambil enzim selulase sebanyak 3 mL lalu di masukkan dalam kuvet Kemudian mengukur absoransinya menggunakan UV-VIS pada panjang gelombang λ 280 nm.

3. Pengujian Aktivitas Enzim Selulase

a. Pembuatan Pereaksi DNS

Menimbang 1 DNS (3,5-dinitrosalisilic acid), melarutkan ke dalam 20 mL larutan NaOH 2 N dan 50 mL aquadest, kemudian menambahkan 30 gram K-Natartrat dan mengaduk dengan magnetik stirer lalu menambahkan aquadest hingga volume akhir 100 mL.

b. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Memasukkan 1 mL larutan standar glukosa (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1) ppm ke dalam tabung reaksi dan 1 mL aquadest sebagai kontrol. Selanjutnya menambahkan sebanyak 1 mL reagen DNS pada larutan standar glukosa tersebut dan menghomogenkan. Memanaskan semua tabung reaksi selama 5 menit dan mendinginkan (Hasanah dan Iwan, 2015). Setelah dingin, mengukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ) 540 nm (Putri, 2016). Selanjutnya, absorbansi masing-masing larutan diplotkan terhadap konsentrasinya sehingga diperoleh nilai slope, intercept, dan R^2 (Sinatari, 2013).

c. Uji Aktivitas Enzim Selulase

Pengujian aktivitas selulase secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan *Dinitro Salisilic Acid* (DNS). Dimasukkan dalam tabung 1 mL fraksi enzim selulase ditambahkan dengan substrat avisel 2% dan buffer fosfat pH 7 masing-masing 1 mL

lalu dihomogekan. Kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Setelah itu ditambahkan 1 mL DNS kemudian dididihkan dalam penangas air pada suhu 100°C selama 5 menit. Tabung reaksi didinginkan dan diukur serapannya dengan panjang gelombang 540 nm (Putri, 2016).

$$AE = \frac{C}{BM \text{ Glukosa} \times t} \times \frac{H}{E}$$

keterangan :

AE = Aktivitas enzim (unit/mL)

C = Konsentrasi glukosa

BM = Berat molekul glukosa (180 g/mol)

t = Waktu inkubasi (menit)

H = Volume total enzim substrat (mL)

E = Volume enzim

4. Penentuan berat molekul dengan Menggunakan SDS-PAGE

1. *Separatig gel* (12,5%)

1,575 mL larutan A (30% b/v akrilamida dan 0,8% b/v bisakrilamida), 1,300 mL larutan B (1,5 M Tris-Cl pH 8,8; 0,4% SDS) ditambah 2,075 mL aquades. 0,05 mL APS 10% dan 0,005 mL TEMED dalam erlenmeyer 50 mL menghomogenkan kemudian menuangkan kedalam cetakan gel, menunggu sampai membeku (Hasnah, 2015).

2. *Stacking gel* (4%)

0,245 mL larutan A (30% b/v akrilamida dan 0,8% b/v bisakrilamida), 0,65 mL larutan C ((1M Tris-Cl pH 6,8; 0,4% SDS) ditambah 1,580 mL aquades, 0,025 mL APS 5% dan 0,0025 mL TEMED dalam erlenmeyer 50 mL menghomogenkan,

menuangkan diatas *separating gel* yang sudah beku kemudian dipasang sisir dan menunggu hingga gel membeku (Hasnah, 2015).

Tabel 4.1: Komposisi Stacking SDS PAGE

Pereaksi	Stacking gel 4% (μL)	Separating gel 12,5% (μL)
Larutan A	245	1575
Larutan B	-	1300
Larutan C	650	-
Aquades	1580	2770
10% APS	25	50
TEMED	2,5	5

3. Persiapan sampel dan pemisahan protein

Protein 20μL mencampur dengan 5μL sampel buffer, menghomogenkan dengan vortex mendidihkan selama 5 menit dan memasukkan ke dalam sumur gel. Protein dipisahkan dengan memberikan aliran listrik (100 mA dan 50 V) gel kemudian diwarnai dengan Comassie blue (Hasnah, 2015).

5. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan perhitungan berat molekul (BM) dari masing-masing protein yang didasarkan pada *marker* yang tersedia. Perhitungan dilakukan dengan mengukur total jarak *tracking* dari *stacking gel* ke *separating gel* (a), dilanjutkan dengan mengukur jarak *tracking* dari *stacking gel* ke masing-masing pita protein yang terbentuk (b), kemudian dicari *retardation factor* (Rf) dengan membagi jarak masing-masing pita dengan jarak tracking total (b/a), selanjutnya dihitung nilai log BM dari masing-masing Bm pita *marker*. Bm pita polipeptida pada sampel dihitung dengan persamaan linier $\{Y = a + bX\}$ dimana nilai Rf sebagai sumbu X dan nilai log Bm sebagai sumbu Y (Hermanto, dkk, 2014).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Hasil Pemurnian Enzim Selulase

a. Dialisis

Tahapan pemurnian ekstrak kasar dimulai dari fraksinasi amonium sulfat atau disebut juga pengendapan garam. Banyak penelitian yang menggunakan dengan cara berikut karena bahan yang digunakan relatif murah, tingkat kelarutannya tinggi dan tidak dapat mempengaruhi struktur protein. Pengendapan dilakukan pada tingkat 0-100%. Setelah dilakukan pengendapan dilakukan pengujian aktivitas dengan metode DNS. Hasil yang memiliki aktivitas tertinggi berada pada fraksi 80%, dari hasil tersebut akan dimurnikan kembali ke tahap selanjutnya, dengan menggunakan metode dialisis.



Gambar 4.1 Hasil Dialisis Enzim Selulase

Pada Gambar 4.1 menunjukkan hasil dialisis yang menunjukkan adanya endapan pada saat penambahan BaCl_2 dan akhir dialisis dihentikan pada saat tidak terbentuknya endapan lagi.

b. Kromatografi Filtrasi Gel

Kromatografi filtrasi gel merupakan tahapan lanjutan pemurnian enzim selulase dengan menggunakan matriks sephadex G-75. Kromatografi filtrasi gel menggunakan bahan pengisi yang merupakan gel berpori-pori. Pori-pori pada permukaan gel ini cukup kecil sehingga mencegah molekul besar untuk masuk ke dalamnya, tetapi dapat menampung molekul-molekul yang lebih kecil. Filtrasi gel digunakan untuk memisahkan protein yang mempunyai berat molekul tinggi dari protein atau molekul lain dengan berat molekul rendah.

Hasil yang diperoleh dari kromatografi filtrasi gel dapat dilihat pada Lampiran 3, di mana pada fraksi 8,9,10,11 dan 12 menghasilkan kadar protein dan aktivitas yang optimum.

2. Penentuan Kadar Protein *Optical Density* (OD)

Fraksi-fraksi enzim selulase hasil kromatografi akan diukur kadar proteinnya dengan menggunakan metode kekeruhan (OD). Tujuan dari penentuan kekeruhan ini yaitu untuk mengetahui pada fraksi ke berapa yang memiliki tingkat kekeruhan yang tertinggi. Adapun kekeruhan yang diperoleh dari hasil kromatografi filtrasi gel dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 4.1 Kadar kekeruhan Hasil Kromatografi Filtrasi Gel

Sampel	Kadar Kekeruhan (mg/mL)
Ekstrak Kasar	2,715
Dialisis	2,624
Fraksi 8	1,261
Fraksi 9	2,282
Fraksi 10	2,605
Fraksi 11	2,240
Fraksi 12	2,178

3. Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS

Fraksi-fraksi yang telah diketahui kadar proteinnya selanjutnya akan diukur aktivitas enzim selulase dengan menggunakan metode asam dinitrosalisilat (DNS), dengan panjang gelombang 540 nm. Berikut aktivitas enzim selulase yang diperoleh dari hasil kromatografi filtrasi gel.

Tabel 4.2 Aktivitas Enzim Selulase dari hasil kromatografi Filtrasi Gel

Sampel	Absorbansi	Konsentrasi Glukosa (mg/mL)	Uni Aktivitas (U/mL)
Ekstrak Kasar	0,397	0,4485	0,0830
Dialisis	0,374	0,4299	0,0796
Fraksi 8	0,356	0,4097	0,0769
Fraksi 9	0,349	0,4154	0,0759
Fraksi 10	0,242	0,3490	0,0598
Fraksi 11	0,314	0,3814	0,0706
Fraksi 12	0,274	0,3231	0,0646

4. Penentuan Berat Molekul Protein dengan menggunakan Elektroforesis Metode SDS-PAGE

Elektroforesis digunakan untuk memisahkan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik. Sebuah arus listrik dilewatkan melalui medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Tingkat kemurnian enzim dapat diketahui dengan menggunakan teknik elektroforesis gel dengan metode SDS-PAGE. Prinsip analisis SDS-PAGE yaitu pemisahan protein berdasarkan ukuran molekul (Putranto, dkk, 2006). Adapun hasil *running* elektroforesis sebagai berikut.

Tabel 4. 3 Hasil *Running* Elektroforesis Endapan Ekstrak Kasar

Sampel	Run	Band	BM kd
Endapan Ekstrak Kasar	3,85	0,80	61,67
	3,85	1,00	49,67
	3,85	1,50	28,92
	3,85	1,80	20,90

Penentuan berat molekul yang memiliki aktivitas enzim selulase dilakukan pada ekstrak kasar, fraksi 8, fraksi 9, fraksi 10, fraksi 11, endapan ekstrak kasar dan endapan fraksi 80%. Hasil pengujian memperlihatkan bahwa hanya pada endapan ekstrak kasar dan endapan fraksi 80%, yang menunjukkan terbentuknya pita protein. Hasil *running* elektroforesis endapan ekstrak kasar pada Tabel 4.3 diperoleh 4 pita yang memiliki berat molekul berturut-turut yaitu 61,67 KDa; 49,67 KDa; 28,92 KDa; dan 20,90 KDa. Hasil *running* elektroforesis endapan fraksinasi 80% pada Tabel 4.4 diperoleh 3 pita yang memiliki berat molekul berturut-turut yaitu 95,87 KDa; 76,57 KDa; dan 61,67 KDa.

Tabel 4. 4 Hasil *Running* Elektroforesis Endapan Fraksinasi 80%

Sampel	Run	Band	BM kd
Endapan Fraksinasi 80%	3,85	0,40	95,87
	3,85	1,60	76,57
	3,85	1,80	61,67

B. Pembahasan

1. Hasil Pemurnian Enzim Selulase

a. Dialisis

Enzim hasil fraksinasi amonium sulfat merupakan enzim semi murni yang artinya masih mengandung sisa-sisa garam sehingga masih perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut agar garam atau ion pengganggu lainnya yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim hilang, untuk menghilangkan garam amonium sulfat maka dilakukan tahap pemurnian dengan menggunakan metode dialisis, yang berprinsip pada perpindahan zat terlarut berkonsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah. Proses dialisis dilakukan dengan merendam saran wrap yang berisi larutan enzim dalam buffer fosfat 0,05 M pH 7 kemudian dilakukan pengujian dengan menambahkan BaCl_2 , agar garam amonium sulfat yang terdapat dalam enzim hilang. Dikatakan menghilang jika pada saat penambahan BaCl_2 tidak terdapat endapan lagi. Keberadaan amonium sulfat dalam larutan bufer diuji dengan penambahan BaCl_2 . Adapun reaksinya seperti berikut:



Endapan putih yang nampak dalam penelitian adalah endapan BaSO_4 yang berwarna putih. Garam BaSO_4 memiliki tingkat kelarutan yang rendah dalam pelarut air sehingga akan tampak sebagai endapan putih (Sari, dkk., 2013).

Konsentrasi larutan buffer yang digunakan pada proses dialisis memiliki konsentrasi yang berbeda dimana larutan yang berada di luar saran lebih rendah dari konsentrasi yang berada dalam saran wrap. Karena pemisahan ini berdasarkan perbedaan konsentrasi pada kedua larutan baik di dalam maupun yang diluar. Maka

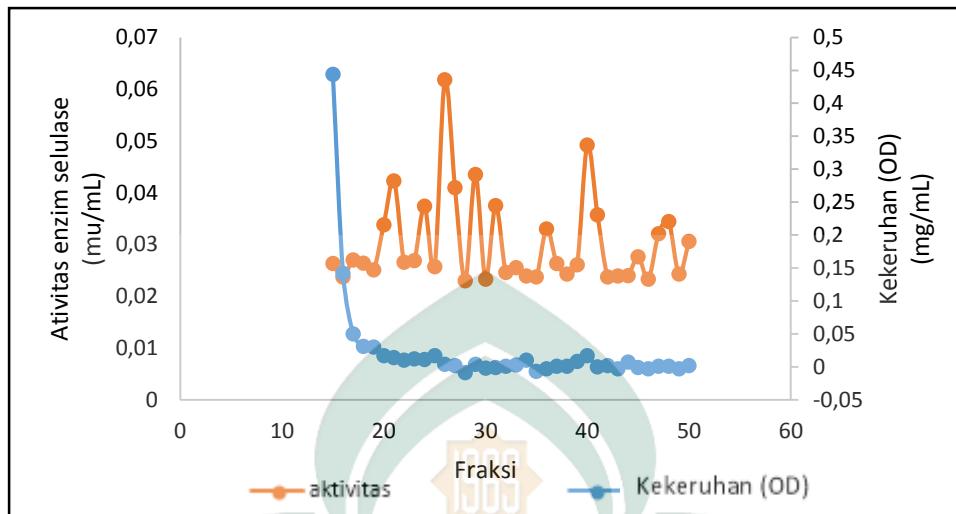
dari itu molekul yang berukuran kecil seperti garam atau ion yang lainnya akan keluar melewati pori-pori plastik sampai konsentrasi didalam dan diluar plastik seimbang.

Hasil dialisis enzim selulase dari fraksinasi amonium sulfat menunjukkan terjadinya penurunan yang tidak signifikan yaitu dari 0,0830 U/mL menjadi 0,0796 U/mL, dari hasil yang diperoleh berbanding terbalik dengan teori yang menyatakan bahwa pada proses dialisis dapat meningkatkan aktivitas enzim. Hal ini disebabkan karena seharusnya hasil dari dialisis dilakukan pemekatan terlebih dahulu dengan menggunakan *Polyethylene Glycol* (PEG), dan juga hilangnya ion logam melalui saran wrap yang ion tersebut dapat mengaktifkan aktivitas enzim selulase (Plummer, 1979).

b. Kromatografi Filtrasi Gel

Enzim selulase hasil dialisis dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi filtrasi gel menggunakan matriks sephadex G-75, huruf G dan nomor 75 menunjukkan bahwa sephadex tersebut dapat dikembangkan dengan air atau buffer dengan besar pengembangannya 75 kali (Seftiono, 2008). Cara kerja dari kolom filtrasi gel ini yaitu molekul yang berukuran kecil dapat memasuki pori-pori dan akan tertahan selama melewati kolom sedangkan molekul yang berukuran lebih besar tidak tertahan dalam pori-pori sehingga akan melewati kolom lebih cepat. Dengan demikian, makin besar nomor tabung hasil fraksi yang menampung eluen dari sistem kromatografi, akan makin kecil ukuran molekul protein yang ada di dalam fraksi. Dalam penelitian ini proses kromatografi matriks sephadex G-75 yang digunakan divacum terlebih dahulu agar tidak terbentuk gelembung di dalam kolom, karena jika terbentuk gelembung maka akan mengganggu kerja kolom filtrasi. Kemudian matriks dimasukkan ke dalam kolom kromatografi dan menampung hasil fraksi masing-masing sebanyak 5 mL

dalam 50 botol vial, untuk hasil kromatografi filtrasi gel dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 4.2: Fraksi-fraksi hasil pemurnian filtrasi gel

Pada Gambar 4.2 dapat dilihat bahwa pada fraksi 1 sampai fraksi 7 protein yang dipisahkan bermuatan sama dengan muatan gugus matriks sehingga protein tersebut terelusi dengan mudah oleh buffer dan keluar terlebih dahulu dari kolom, dimana pada fraksi-fraksi tersebut bukan enzim selulase dilihat dari kecilnya nilai aktivitas yang diperoleh. Pada fraksi yang merupakan enzim selulase berada pada fraksi yang memiliki nilai aktivitas tertinggi dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan pada Lampiran 3 hal 50, yang menunjukkan adanya 5 puncak aktivitas tertinggi yaitu pada fraksi 8, 9, 10, 11, dan 12. Puncak aktivitas enzim selulase yang paling tertinggi diperoleh dari fraksi 8 dengan aktivitas sebesar 0,0769 U/mL. Namun untuk fraksi selanjutnya aktivitas enzim selulase relatif rendah hal ini menunjukkan pada fraksi tersebut masih terdapat protein lain yang memiliki bobot molekul yang sama dengan enzim selulase. Puncak aktivitas yang dihasilkan berbeda sepanjang profil, hal ini menggambarkan pemisahan berdasarkan berat molekul protein yang terjadi dalam sistem kromatografi. Pada

penelitian ini juga sudah sesuai teori (Seftiono, 2008) yang menyatakan bahwa antara aktivitas dan kadar protein berbanding terbalik dimana semakin tinggi aktivitas maka kadar protein yang terkandung di dalamnya semakin rendah, karena telah berkurangnya pengotor berupa protein lain yang tidak diinginkan atau metabolit lain.

2. Penentuan Kadar Protein *Optical Density* (OD)

Penentuan kadar protein dilakukan dengan analisis kuantitatif dengan menggunakan metode kekeruhan (OD) untuk mengetahui banyaknya protein dalam larutan. Untuk mengetahui kadar protein dari 50 fraksi lebih efektif digunakan pengukuran berdasarkan kekeruhan.

Pada uji ini dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm. Dari hasil pembacaan ini diperoleh kadar protein yang dapat dilihat dari tingkat kekeruhannya. Berdasarkan nilai korelasi kurva standar yang diperoleh dapat dilihat kadar protein hasil penelitian pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa kadar protein tertinggi berada pada fraksi ke 10 sebesar 2,605mg/mL hasil yang diperoleh diharapkan tidak terdapat protein lain selain enzim selulase. Sementara pengukuran protein secara spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm yang menghasilkan 1 OD berarti sampel tersebut mengandung protein dengan konsentrasi 1 mg/ml. Hasil yang diperoleh berbanding lurus dengan hukum lambert beer dimana semakin banyak jumlah sampel yang diukur maka semakin besar kadar yang diperoleh.

3. Pengujian Aktivitas dengan Metode *Dinitrosalisilic acid* (DNS)

Prinsip pengujian aktivitas enzim selulase merupakan reaksi antara enzim dan substrat yang akan menghasilkan produk berupa glukosa, produk ini akan bereaksi dengan dinitrosalisilat. Lalu konsentrasi produk ini akan diukur dengan

spektrofotometer UV-Vis. Kemudian reaksi antara enzim dan substrat dihentikan dengan menambahkan DNS. Lalu DNS direduksi oleh glukosa karena adanya gula pereduksi yang merupakan hasil hidrolisis substrat oleh selulase. Selanjutnya dinitrosalisilat yang terdiri atas komponen utama asam 3,5- dinitrosalisilat yang berwarna kuning akan mengalami reaksi reduksi menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Selain itu DNS juga berfungsi memberikan warna pada larutan sehingga absorbannya dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm.

Kadar gula reduksi ditentukan dengan membuat kurva standar glukosa tujuannya agar diketahui konsentrasi larutan dengan nilai absorbansinya. Dalam pembuatan kurva standar lebih dipilih menggunakan glukosa karena glukosa termasuk gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa oleh enzim selulase. Kurva standar dibuat dengan variasi konsentrasi glukosa 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 (ppm). Hasil kurva standar glukosa memiliki persamaan linear $y = 1,236x - 0,1574$ dengan nilai korelasi sebesar 0,9987 (Lampiran 5). persamaan ini digunakan untuk mengetahui konsentrasi glukosa pada sampel yang akan diuji. Dari nilai korelasi yang diperoleh maka penentuan aktivitas enzim pada 50 fraksi dapat diketahui.

Nilai aktivitas enzim yang diperoleh membuktikan adanya protein yang terkandung di dalam fraksi. Berdasarkan data hasil penelitian pada Tabel 4.2 menunjukkan bahwa aktivitas enzim tertinggi berada pada fraksi enzim ke 8 sebesar 0,0769 U/mL. Penelitian yang dilakukan oleh Lisdayanti, dkk (2012) yang mengisolasi selulase dari bakteri selulolitik menghasilkan aktivitas selulase sebesar 0,021-3,062 u/mL.

4. Penentuan Protein menggunakan Elektroforesis Metode SDS-PAGE

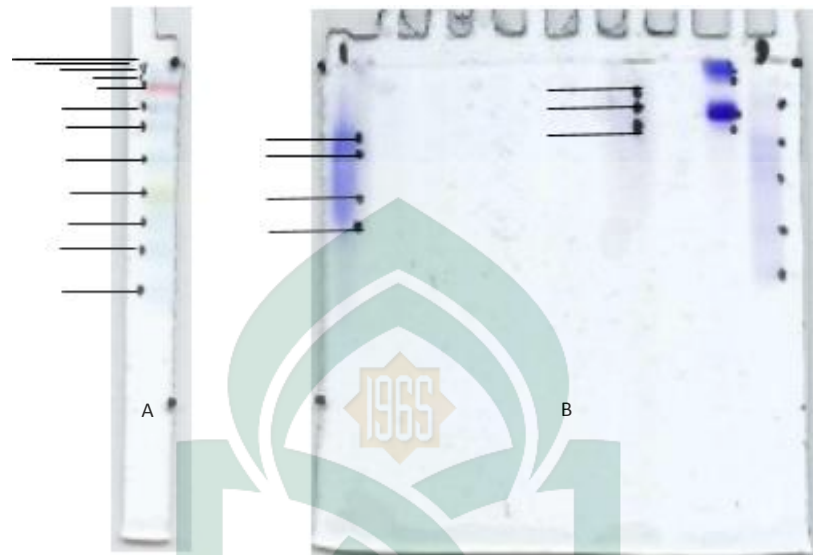
Metode SDS-PAGE sering digunakan untuk menentukan berat molekul suatu protein dengan menggunakan gel poliakrilamid yang terdiri dari 2 gel yaitu gel pemisah dan gel penahan. Gel pemisah berfungsi sebagai tempat dimana protein akan bergerak atau berpindah menuju anoda, sedangkan gel penahan berfungsi sebagai gel tempat meletakkan sampel yang terdapat di beberapa dinding sumur.

Pembuatan APS 10% yang berfungsi sebagai inisiator yang dapat mengaktifkan akrilamid agar bereaksi dengan gel poliakrilamida lain membentuk rantai polimer yang panjang sehingga membuat gel pemisah dan gel penahan memadat. Komposisi pembuatan gel pemisah dan gel penahan hampir sama yang membedakan hanya jumlah bahan yang akan ditambahkan. setelah pembuatan gel selanjutnya sampel yang akan di *running* di lakukan preparasi sampel terlebih dahulu.

Preparasi dilakukan dengan memasukkan sampel enzim ke tabung eppendof sebanyak 0,5 μ L lalu ditambahkan buffer sampel yang mengandung SDS dan β -*mercaptoetanol*. Fungsi SDS yaitu memberikan muatan negatif pada sampel yang dianalisis dan β -*mercaptoetanol* berfungsi untuk mereduksi ikatan disulfida pada protein. Kemudian sampel divortex berfungsi untuk menghomogenkan antara sampel dengan buffer sampel. Setelah itu dipanaskan sehingga sampel dapat terdenaturasi sempurna. Alat elektroforesis di pasang dan dimasukkan buffer elektroforesis yang berfungsi sebagai penghantar listrik yang membantu memisahkan sampel saat alat dinyalakan.

Dari hasil penelitian elektroforesis yang dilakukan pada sampel enzim selulase diperoleh pita protein. Kemudian pita yang terbentuk dihitung panjang atau Rf sehingga diperoleh BM sampel. Pada penelitian ini dibuat 10 sumuran yang berfungsi untuk tempat memasukkan sampel, sumuran pertama diisi dengan protein

marker. Marker protein dari Jena Bioscience yang memiliki berat molekul 5-250 kDa. Untuk sumuran selanjutnya berturut-turut diisi dengan ekstrak kasar, fraksi 8, fraksi 9, fraksi 10, fraksi 11, endapan ekstrak kasar dan hasil endapan fraksinasi 80%.



Gambar 4.3 A (Marker) B (Sampel)

Pada Gambar 4.3 bagian A menunjukkan hasil *running* elektroforesis untuk marker protein, dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa 12 pita yang menunjukkan berat molekul yang berbeda-beda, marker protein ini menjadi standar yang digunakan dalam mengetahui berat molekul protein yang ada pada sampel. Bagian B menunjukkan hasil *running* elektroforesis untuk sampel, dapat dilihat pada gambar bagian B tidak semua sampel menunjukkan pita.

Penentuan berat molekul dari penelitian ini merupakan hasil karakterisasi protein, yang diperoleh data hasil *running* elektroforesis untuk endapan ekstrak kasar dapat dilihat pada Tabel 4.4, diperoleh 4 pita yang memiliki berat molekul berturut-turut yaitu 61,67 KDa; 49,67 KDa; 28,92 KDa; dan 20,90 KDa. Hasil *running* elektroforesis hasil endapan fraksinasi 80% pada Tabel 4.5 diperoleh 3 pita yang memiliki berat molekul berturut-turut yaitu 95,87 KDa; 76,57 KDa; dan 61,67 KDa.

Perbedaan pita yang diperoleh dikarenakan tingkat kemurnian yang berbeda dan berdasarkan dari jauh jarak pergerakan pitanya yang dihitung dengan persamaan linear ($Y = a + bX$).

Menurut Oktavia (2014), hasil pengujian elektroforesisnya memperlihatkan bahwa pita hanya terbentuk pada ekstrak kasar dan pelet hasil pengendapan saja dengan berat molekul 217,96 KDa, 163,15 KDa, 129,41 KDa dan 76,84 KDa. Hal ini menandakan bahwa pada fraksi hasil pemurnian tidak memperlihatkan pita karena kecilnya jumlah protein dan aktivitas enzim serta terjadinya penumpukan pita pada berat molekul yang rendah. Hal ini sesuai teori (Ilminingtyas, dkk 2010) bahwa pada sampel yang tidak menunjukkan pita disebabkan karena terjadinya perubahan sifat pada protein tersebut.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka dapat disimpulkan bahwa hasil karakterisasi protein enzim selulase menggunakan alat elektroforesis protein diperoleh pada endapan ekstrak kasar memiliki berat molekul berturut-turut yaitu 61,67 KDa; 49,67 KDa; 28,92 KDa; dan 20,90 KDa. Sedangkan endapan fraksinasi 80% memiliki berat molekul berturut-turut yaitu 95,87 KDa; 76,57 KDa; dan 61,67 KDa.

B. Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu sebaiknya dilakukan purifikasi lebih lanjut dengan metode lain untuk mendapatkan enzim selulase murni seperti metode *isoelectric focusing* atau kromatografi penukar ion dan dilakukan pewarnaan *western blotting* pada akhir elektroforesis.

DAFTAR PUSTAKA

Al-Qur'anul Al Karim

Ahmad, Riza Sainuddin. "Pemanfaatan Khamir *Saccharomyces cerevisiae* untuk Ternak". *J. Wartazoa* 15, no. 1 (2005): h. 49-55.

Anam, Khairul. "SDS PAGE dengan Silver Staining dan Zimogram". *Laporan praktikum*, (2009).

Anggarani, dkk., "Identifikasi Protein Spesifik Biofilm *Candida Albicans* Sebagai Target Penentuan Protein Spesifik Antigenik", *J. Seminar Nasional Kimia* 3, no. 1 (2014): h.49-60.

Anggarawati, Desi. "Aktivitas Enzim Selulase Isolat SGS 2609 BBP4B-KP Menggunakan Substrat Limbah Pengolahan Rumput Laut yang Dipretratmen dengan Asam". *Skripsi*. Depok: Fakultas Teknik Universitas Indonesia, 2012.

Anja, dkk. "Pemurnian dan Karakterisasi Xilanase *sterptomyces* sp". *J. Makara Sains* 12, no. 3 (2008): h.55-60.

Arjita, I Putu Dedy. "Analisis Protein Jaringan Otak Sapi dengan Metode Isolasi, Purifikasi dan Visualisasi". *J. Ganec Swara* 3, no. 2 (2009): h.55-58.

Ariyani, dkk. "Eksplorasi Mikroba Penghasil Enzim Protease Dari sumber Air Panas Lejja Kabupaten Soppeng". *J. Indonesia Chimica Acta*. 1 no.3 (2014): h.1-11.

Chasanah, dkk, dkk. "Karakterisasi Enzim Selulase PMP 0126y Dari Limbah Pengolahan Agar". *J. Perikanan* 8, no. 2 (2013): h. 103-114.

Corin, Chintya dan Tri Ardyati. "Produksi Protein Sel Tunggal Isolat Khamir Asal Limbah Pabrik Kecap dengan Metode Co-Culture". *J. Biotropika* 2, no. 3 (2014): h. 181-185.

Dini, Idah Rahma dan Ifah Munifah. "Produksi dan Karakterisasi Enzim Selulase Ekstrak Kasar dari Bakteri yang Diisolasi dari Limbah Rumput Laut". *J. Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia* 6, no. 3 (2014): h.70-77.

Dewi, Iche Marina. "Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Kitinase Termofilik Kasar dari Sumber Air Panas Tinggi Raja". *Tesis*. Medan: Universitas Sumatera Utara, 2008.

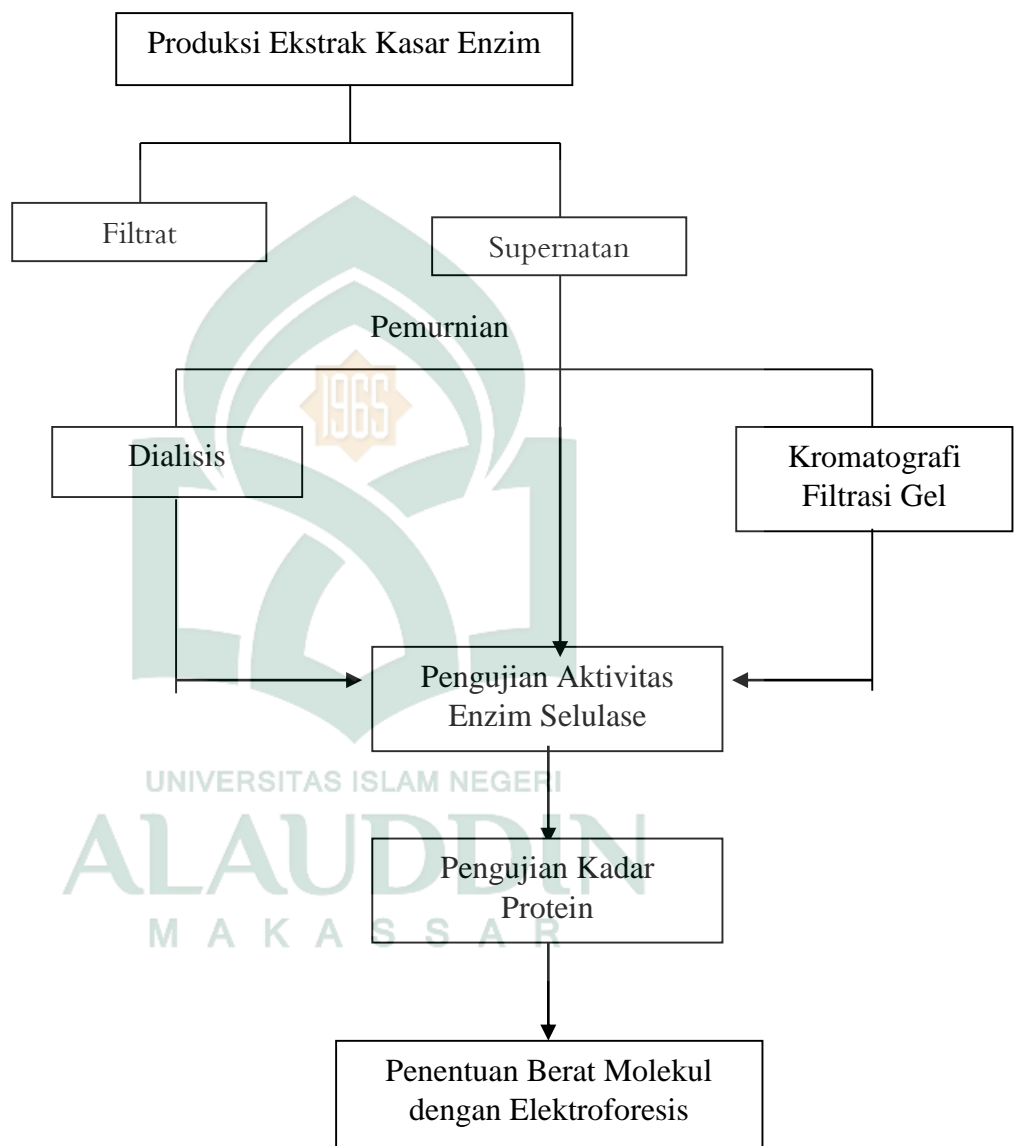
Dewi, Nia Yuliana. "Penetapan kadar dan Analisis Profil Protein dan Asam Amino Ekstrak Ampas Biji Jinten Hitam (*Nigella Sativa* Linn) dengan metode SDS PAGE dan KCKT". *Skripsi*. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah, 2013.

Fajarwati, Sri. "Produksi Protein Sel Tunggal *Candida* utilis Pada Media Molase dengan Penambahan Glukosa dan Urea". *Skripsi*. Semarang: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro, 2002.

Gandjar, Indrawati dan Wellyzar Sjamsuridzal. *Mikologi: Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia Anggota IKAPI, 2006.

- Hermanto, dkk., "Aplikasi Metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) untuk Mengidentifikasi Sumber Asal Gelatin Pada Kapsul Keras". *J. Kimia Valensi* 1, no. 1 (2014): h. 26-32.
- Hasnah, Natsir. "Teknik Isolasi dan Karakterisasi Enzim Fraksinasi dan Pemurnian Protein Teknik Penentuan Berat Molekul Protein Menggunakan metode SDS PAGE". *Pelatihan*. Makassar: UIN Alauddin Makassar, 2015.
- Hidayat. "Studi Optimasi Proses Biosolubilisasi Batu Bara Oleh Kapang Hasil Isolasi dari Pertambangan Batu Bara Sumatera Selatan Berdasarkan Karakteristik Enzim Ekstraseluler Produk yang Dihasilkan". *Skripsi*. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah, 2011.
- Hermanto, dkk. "Aplikasi Metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) untuk Mengidentifikasi Sumber Asal Gelatin Pada Kapsul Keras". *J. Kimia Valensi* 1, (2014): h.26-32.
- Idiawati, Nora. "Produksi Enzim Selulase oleh *Aspergillus niger* Pada Ampas Sagu". *J. Natur Indonesia* 16, no. 1 (2014): h. 1-9.
- Irawati, Rosyida. "Karakterisasi pH, Suhu dan Konsentrasi Substrat Pada Enzim Selulase Kasar Yang Diproduksi Oleh *Bacillus Circulans*". *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains Dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim, 2016.
- Ismatullahjay, Muhammad. "Uji Aktivitas Enzim Selulase Pada Kapang dari Perairan Pulau Pari Kepulauan Seribu". *Skripsi*. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor, 2014.
- Kanti, dkk., "Aktivitas CMC-Ase Khamir *Candida*, sp yang Diisolasi dari Tanah Kebun Biologi Wamena, Papua". *J. Berita Biologi* 6, no.5 (2003): h.655-660.
- Kanti, Atit. "Identifikasi Jenis Khamir yang Diisolasi dari Tanah Gambut Taman Nasional Bukit Duabelas Jambi". *J. BioSMart* 6, no. 1 (2004): h. 10-14.
- Kamila, Laili. "Pencirian Selulolitik Isolat Khamir *Rhodotorula* sp. Dari Tanah Hutan Taman Nasional Gunung Halimun". *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor (2003): h. 1-7.
- Katsir. *Tafsir Ibnu Katsir*. Jakarta: Pustaka Imam Asy-Syafi'i. 2002
- Mayasari. "Pemurnian Enzim Amilase Kasar dari Bakteri Amilolitik Endogenous Bekatul Secara Parsial Menggunakan Ammonium Sulfat". *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang (2016).
- Oktavia, Yulia, dkk. "Karakteristik Enzim Kasar Selulase Kapang Endofit dari Lamulln". *J. Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis* 6, no. 1 (2014): h. 209-218.
- Poedjiadi, Anna dan F. M. Titin Supriyanti. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press, 2012.
- Plummer. "An Introductio to Partical Biochemistry". TataMc Braw-Hill. New Delhi. 1979.
- Purwanto, Maria Goretti M. "Perbandingan Analisa Kadar Protein Terlarut dengan Berbagai Metode Spektroskopi UV-Visible". *J. Ilmiah Sain dan Teknologi* (2014): h. 64-70.

- Putri, Syarafina. "Karakterisasi Enzim Selulase yang Dihasilkan Oleh *Lactobacillus Plantrum* Pada Variasi Suhu, PH dan Konstentrasi Substrat". *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang (2016).
- Rachmania. "Profil Berat Molekul Enzim Protease Buah Nanas (*Ananas Comosus* L.Merr) Dan Pepaya (*Carica Papaya L.*) Menggunakan Metode SDS-PAGE". *J. Penelitian Kimia*, 13 no.1 (2017): h.52-65.
- Sari, Ni Ketut. "Pembuatan Bioetanol Dari Rumput Gajah Dengan Sistilasi Batch". *J. Teknik Kimia Indonesia* 8, no 3 (2009): h. 94-103.
- Sari, dkk., "Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi α -amilase dari *Saccharomycerevisae* FNCC 3012". *J. Chem Info*, 1 no. 1 (2013) h.337-344.
- Saputra, Fahrur Rahman. "Aplikasi Metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) Untuk Mengidentifikasi Sumber Gelatin Pada Kapsul Keras". *Skripsi*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah Jakarta, 2014.
- Seftiono, Hermawan. "Pemurnian dan Karakterisasi Mananase dari *Streptococcus* *luteoalbus*". *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor, 2008.
- Shihab, M. Quraish. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati, 2002.
- Sinatari, dkk., "Pemurnian Selulase dari Isolat KB Kompas Termofilik Desa Bayat Klaten Menggunakann Fraksinasi Amonium Sulfat". *J.Chem Info*, 1 no. 1 (2013): h.130-140.
- Sonia, dkk., "Isolasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Selulase dari Isolat Bakteri OS-16 Asal Padang Pasir Tengger Bromo". *J. Pangan dan Agroindustri* 3, no.4 (2015): h. 11-19.
- Subekti. "Analisis Imunogenisitas Protein Gra1 Dari Hasil Kloning Gen *Gra1* Takizoit *Toxoplasma Gondii*". *J.Berita Biologi* 11 no.1 (2012): h. 43-52
- Supriyatna, Ateng., dkk., "Aktivitas Enzim Amilase, Lipase dan Protease dari Larva *Hermetia illucens* yang Diberi Pakan Jerami Padi". *J. Biokimia* 5, no. 2 (2015): h. 18-31.
- Umniyatie, dkk., "Optimalisasi Enzim Selulase Kapang dari Lahan Pertanian Daerah Wukirsari Pasca Erupsi Merapi". *J. Sains Dasar* 8, no. 1 (20015): h. 77-86.
- Yuneta, dkk., "Pengaruh Suhu Pada Lipase dari Bakteri *Bacillus subtilis*". *J. Prosiding Kimia FMIPA* (2010): h. 1-5.

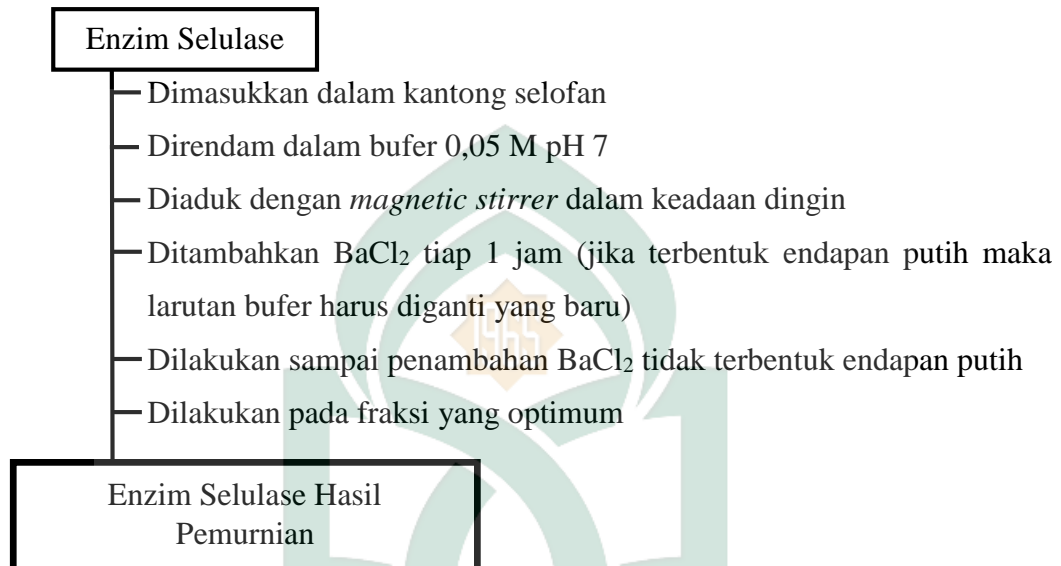
LAMPIRAN 1**Skema Penelitian**

Lampiran 2

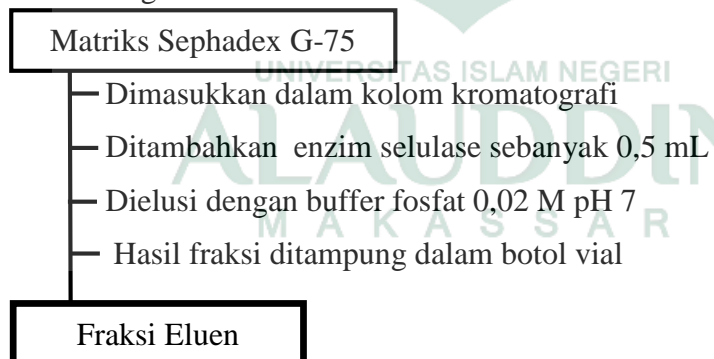
Skema Prosedur Penelitian

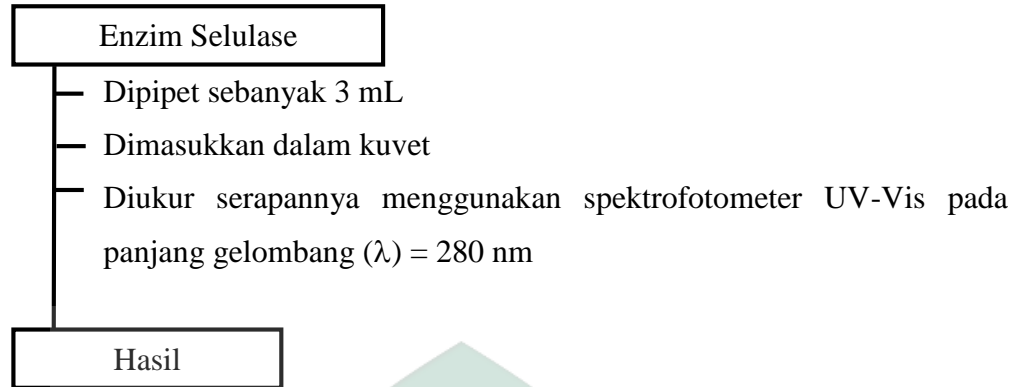
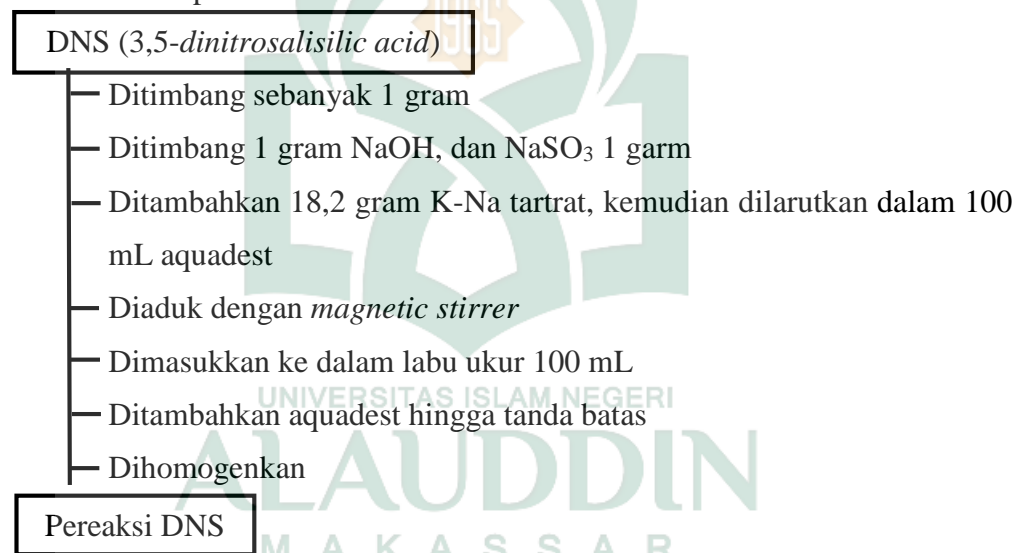
A. Pemurnian Enzim Selulase

1. Dialisis Enzim Selulase



2. Kromatografi Filtrasi Gel



B. Penentuan Kadar Protein *Optical Density* (OD)**C. Uji Aktivitas Enzim Selulase****1. Pembuatan pereaksi DNS**

2. Pembuatan kurva standar glukosa

Larutan glukosa (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1) ppm

- Dimasukkan 1 mL ke dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1 mL aquadest
- Ditambahkan 1 mL pereaksi DNS
- Dihomogenkan
- Dipanaskan selama 5 menit
- Didinginkan
- Diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ) = 540 nm

Kurva Standar Glukosa

3. Uji aktivitas enzim selulase metode DNS (3,5-dinitrosalisilic acid)

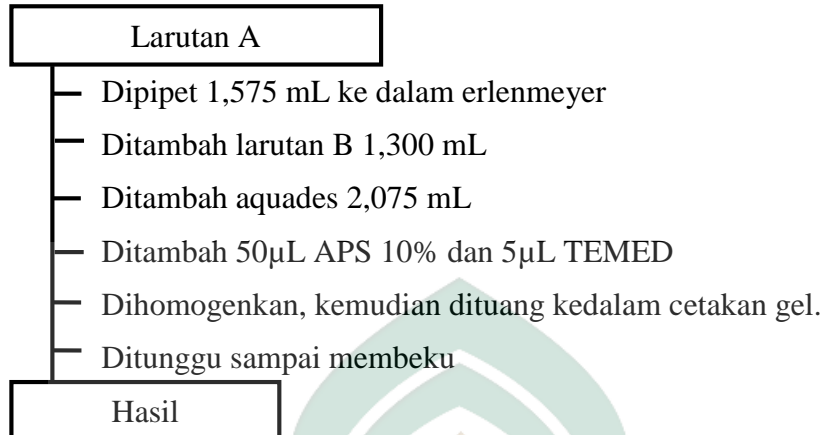
Hasil dari dialisis, kromatografi filtrasi gel dan ekstrak kasar enzim

- Dipipet sebanyak 1 mL masing-masing
- Ditambahkan 1 mL larutan avisel 2%
- Dimasukkan dalam tabung
- Diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50°C
- Ditambahkan 1 mL pereaksi DNS
- Dididihkan selama 15 menit pada penangas air
- Didinginkan
- Ditambahkan aquades sampai volume menjadi 10 mL
- Dihomogenkan
- Diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang (λ) = 540 nm

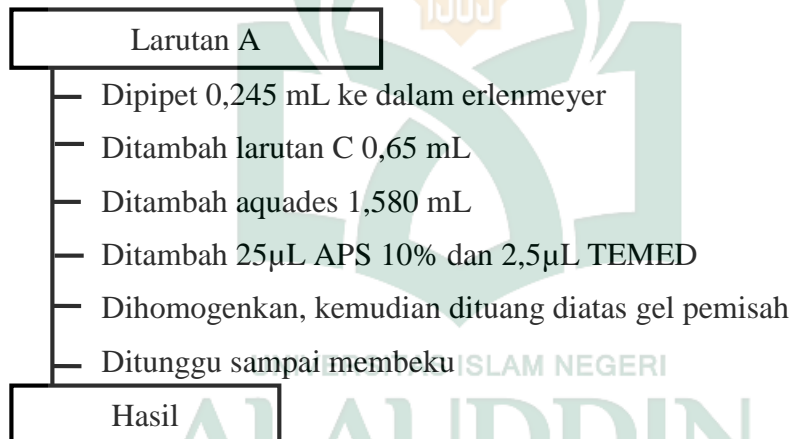
Hasil

D. Penentuan profil protein dengan SDS PAGE

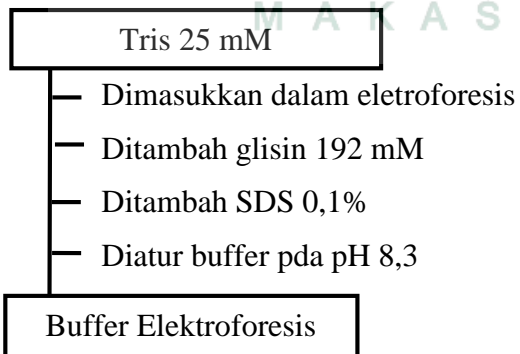
1. Gel Pemisah 12,5%



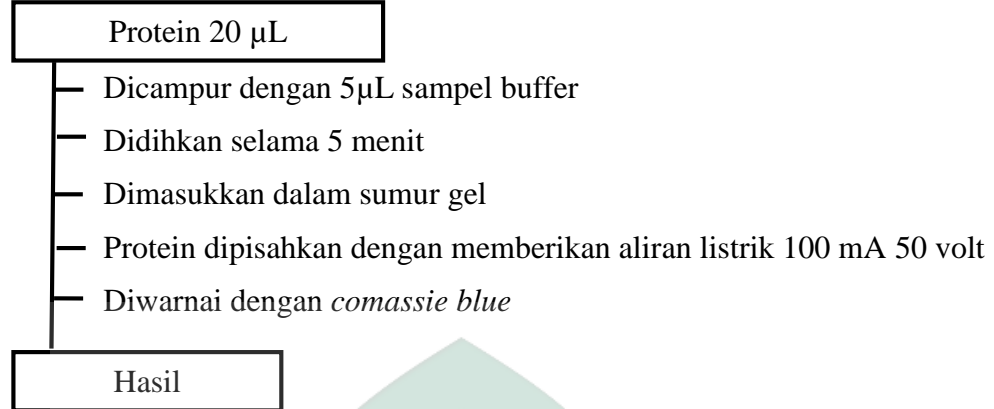
2. Gel Penahan 4%



3. Buffer Elektroforesis



4. Persiapan sampel dan pemisahan protein



Lampiran 3: Fraksi-fraksi Hasil Kromatografi Filtrasi Gel

No	Sampel	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas (U/mL)
1	Fraksi 1	0,017	0,0333
2	Fraksi 2	0,030	0,0330
3	Fraksi 3	0,234	0,0327
4	Fraksi 4	0,310	0,0275
5	Fraksi 5	0,330	0,0239
6	Fraksi 6	0,364	0,0231
7	Fraksi 7	0,593	0,0473
8	Fraksi 8	1,261	0,0769
9	Fraksi 9	2,282	0,0759
10	Fraksi 10	2,605	0,0598
11	Fraksi 11	2,240	0,0706
12	Fraksi 12	2,178	0,0646
13	Fraksi 13	2,008	0,0618
14	Fraksi 14	1,005	0,0450
15	Fraksi 15	0,444	0,0263
16	Fraksi 16	0,142	0,0237
17	Fraksi 17	0,050	0,0270
18	Fraksi 18	0,031	0,0264
19	Fraksi 19	0,030	0,025
20	Fraksi 20	0,017	0,0338
21	Fraksi 21	0,014	0,0423
22	Fraksi 22	0,010	0,0266
23	Fraksi 23	0,012	0,0269
24	Fraksi 24	0,011	0,0374
25	Fraksi 25	0,017	0,0257
26	Fraksi 26	0,004	0,0618
27	Fraksi 27	0,002	0,0410
28	Fraksi 28	-0,009	0,0230
29	Fraksi 29	0,004	0,0435
30	Fraksi 30	-0,002	0,0233
31	Fraksi 31	-0,001	0,0375
32	Fraksi 32	0,001	0,0246
33	Fraksi 33	0,003	0,0255
34	Fraksi 34	0,010	0,0239
35	Fraksi 35	-0,007	0,0237
36	Fraksi 36	-0,003	0,0330
37	Fraksi 37	0,001	0,0263
38	Fraksi 38	0,001	0,0243
39	Fraksi 39	0,008	0,0261
40	Fraksi 40	0,017	0,0492
41	Fraksi 41	0,000	0,0357
42	Fraksi 42	0,002	0,0237
43	Fraksi 43	-0,003	0,0239

44	Fraksi 44	0,007	0,0240
45	Fraksi 45	-0,001	0,0276
46	Fraksi 46	-0,003	0,0233
47	Fraksi 47	0,001	0,0321
48	Fraksi 48	0,001	0,0344
49	Fraksi 49	0,003	0,0243
50	Fraksi 50	0,002	0,0306



Lampiran 4: Penentuan Kadar Protein Enzim Selulase dari *Candida utilis* Hasil

Kromatografi Filtrasi Gel dengan Metode Optical Density (OD)

No	Sampel	Absorbansi	Kadar Protein (mg/mL)
1	Fraksi 1	0,017	0,017
2	Fraksi 2	0,030	0,030
3	Fraksi 3	0,234	0,234
4	Fraksi 4	0,310	0,310
5	Fraksi 5	0,330	0,330
6	Fraksi 6	0,364	0,364
7	Fraksi 7	0,593	0,593
8	Fraksi 8	1,261	1,261
9	Fraksi 9	2,282	2,282
10	Fraksi 10	2,605	2,605
11	Fraksi 11	2,240	2,240
12	Fraksi 12	2,178	2,178
13	Fraksi 13	2,008	2,008
14	Fraksi 14	1,005	1,005
15	Fraksi 15	0,444	0,444
16	Fraksi 16	0,142	0,142
17	Fraksi 17	0,050	0,050
18	Fraksi 18	0,031	0,031
19	Fraksi 19	0,030	0,030
20	Fraksi 20	0,017	0,017
21	Fraksi 21	0,014	0,014
22	Fraksi 22	0,010	0,010
23	Fraksi 23	0,012	0,012
24	Fraksi 24	0,011	0,011
25	Fraksi 25	0,017	0,017
26	Fraksi 26	0,004	0,004
27	Fraksi 27	0,002	0,002
28	Fraksi 28	-0,009	-0,009
29	Fraksi 29	0,004	0,004
30	Fraksi 30	-0,002	-0,002
31	Fraksi 31	-0,001	-0,001
32	Fraksi 32	0,001	0,001
33	Fraksi 33	0,003	0,003
34	Fraksi 34	0,010	0,010
35	Fraksi 35	-0,007	-0,007
36	Fraksi 36	-0,003	-0,003
37	Fraksi 37	0,001	0,001
38	Fraksi 38	0,001	0,001
39	Fraksi 39	0,008	0,008
40	Fraksi 40	0,017	0,017
41	Fraksi 41	0,000	0,000

42	Fraksi 42	0,002	0,002
43	Fraksi 43	-0,003	-0,003
44	Fraksi 44	0,007	0,007
45	Fraksi 45	-0,001	-0,001
46	Fraksi 46	-0,003	-0,003
47	Fraksi 47	0,001	0,001
48	Fraksi 48	0,001	0,001
49	Fraksi 49	0,003	0,003
50	Fraksi 50	0,002	0,002

Kadar Protein dalam Fraksi Enzim

Dalam penentuan kadar protein dengan metode OD berbanding lurus dengan kadar protein dimana $1 \text{ OD} = 1 \text{ mg/mL}$. Hal ini juga sesuai dengan hukum lambert beer yang menyatakan banyaknya jumlah sampel berbanding lurus dengan konsentrasi yang dihasilkan.

Lampiran 5: Kurva Standar Pengukuran Konsentrasi Glukosa untuk Penentuan Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat)

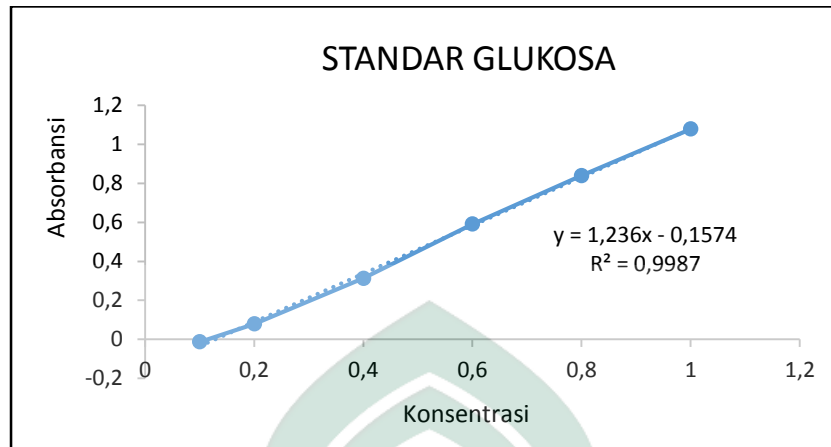
1. Data kurva kalibrasi larutan standar glukosa pada $\lambda = 540 \text{ nm}$

No.	Konsentrasi	Absorbansi
1.	0,1	-0,013
2.	0,2	0,079
3.	0,4	0,313
4.	0,6	0,591
5.	0,8	0,839
6.	1,0	1,078

2. Data analisis kurva kalibrasi larutan standar glukosa

No.	Konsentrasi (x)	Absorban (y)	x^2	y^2	xy
1.	0,1	-0,013	0,01	-0,00016	-0,0013
2.	0,2	0,079	0,04	0,00624	0,0158
3.	0,4	0,313	0,16	0,09796	0,1252
4.	0,6	0,591	0,36	0,34928	0,3546
5.	0,8	0,839	0,64	0,70392	0,6712
6.	1,0	1,078	1	1,16208	1,078
N = 6	$\Sigma = 3,1$	$\Sigma = 2,887$	$\Sigma = 2,21$	$\Sigma = 2,31932$	$\Sigma = 2,2435$
	$\Sigma = 0,5166$	$\Sigma = 0,4881$			

3. Grafik kurva kalibrasi larutan standar glukosa



4. Analisis Data:

a. Persamaan garis linear

$$y = ax + b$$

$$y = ax - b$$

$$a = \frac{n \times \sum xy - \sum x \times \sum y}{n \times \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$a = \frac{6 \times 2,2435 - 3,1 \times 2,887}{6 \times 2,21 - (3,1)^2}$$

$$a = \frac{13,461 - 8,9497}{13,26 - 9,61}$$

$$a = \frac{4,5113}{3,65}$$

$$a = 1,2360$$

$$b = y \text{ rata-rata} - ax \text{ rata-rata}$$

$$= 0,4811 - (1,2360 \times 0,5166)$$

$$= 0,4811 - 0,6385$$

$$= -0,1574$$

Jadi, persamaan linear yang diperoleh adalah:

$$y = 1,1682x - 0,0944$$

b. Nilai Regresi (R^2)

$$R^2 = \frac{n \times \sum xy - \sum x \times \sum y}{\sqrt{((n \times \sum x^2) - (\sum x)^2) ((n \times \sum y^2) - (\sum y)^2)}}$$

$$R^2 = \frac{6 \times 2,2435 - 3,1 \times 2,887}{\sqrt{((6 \times 2,21) - (3,1)^2) - ((6 \times 2,31932) - (2,887)^2)}}$$

$$R^2 = \frac{13,461 - 8,9497}{\sqrt{(13,26 - 9,61) (13,916 - 8,3347)}}$$

$$R^2 = \frac{4,5113}{\sqrt{(3,65 \times 5,6263)}}$$

$$R^2 = \frac{4,5113}{\sqrt{20,5359}}$$

$$R^2 = \frac{4,5113}{4,5316}$$

$$R^2 = 0,9955$$

Lampiran 6: Penentuan Aktivitas Enzim Selulase dari *Candida utilis* Hasil Kromatografi Filtrasi Gel dengan Metode DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat)

No	Sampel	Absorbansi	Kadar Glukosa (mg/mL)	Aktivitas (U/mL)
1	Fraksi 1	0,065	0,1799	0,0333
2	Fraksi 2	0,063	0,1783	0,0330
3	Fraksi 3	0,061	0,1767	0,0327
4	Fraksi 4	0,026	0,1484	0,0275
5	Fraksi 5	0,002	0,1290	0,0239
6	Fraksi 6	-0,003	0,1249	0,0231
7	Fraksi 7	0,158	0,2552	0,0473
8	Fraksi 8	0,356	0,4154	0,0769
9	Fraksi 9	0,349	0,4097	0,0759
10	Fraksi 10	0,242	0,3231	0,0598
11	Fraksi 11	0,314	0,3814	0,0706
12	Fraksi 12	0,274	0,3490	0,0646
13	Fraksi 13	0,255	0,3337	0,0618
14	Fraksi 14	0,143	0,2430	0,0450
15	Fraksi 15	0,018	0,1419	0,0263
16	Fraksi 16	0,001	0,1282	0,0237
17	Fraksi 17	0,023	0,1460	0,0270
18	Fraksi 18	0,019	0,1427	0,0264
19	Fraksi 19	0,010	0,1354	0,0251
20	Fraksi 20	0,068	0,1824	0,0338
21	Fraksi 21	0,125	0,2285	0,0423
22	Fraksi 22	0,020	0,1435	0,0266
23	Fraksi 23	0,022	0,1451	0,0269
24	Fraksi 24	0,092	0,2018	0,0374
25	Fraksi 25	0,014	0,1387	0,0257

26	Fraksi 26	0,255	0,3337	0,0618
27	Fraksi 27	0,116	0,2212	0,0410
28	Fraksi 28	-0,004	0,1241	0,0230
29	Fraksi 29	0,133	0,2350	0,0435
30	Fraksi 30	-0,002	0,1257	0,0233
31	Fraksi 31	0,093	0,2026	0,0375
32	Fraksi 32	0,007	0,1330	0,0246
33	Fraksi 33	0,013	0,1379	0,0255
34	Fraksi 34	0,002	0,1290	0,0239
35	Fraksi 35	0,001	0,1282	0,0237
36	Fraksi 36	0,063	0,1783	0,0330
37	Fraksi 37	0,018	0,1419	0,0263
38	Fraksi 38	0,005	0,1314	0,0243
39	Fraksi 39	0,017	0,1411	0,0261
40	Fraksi 40	0,171	0,2657	0,0492
41	Fraksi 41	0,081	0,1929	0,0357
42	Fraksi 42	0,001	0,1282	0,0237
43	Fraksi 43	0,002	0,1290	0,0239
44	Fraksi 44	0,003	0,1298	0,0240
45	Fraksi 45	0,027	0,1492	0,0276
46	Fraksi 46	-0,002	0,1257	0,0233
47	Fraksi 47	0,057	0,1735	0,0321
48	Fraksi 48	0,072	0,1856	0,0344
49	Fraksi 49	0,018	0,1419	0,0263
50	Fraksi 50	0,047	0,1654	0,0306

A. Konsentrasi Glukosa dalam Fraksi Enzim

Berikut salah satu contoh perhitungan untuk mendapat konsentrasi glukosa dalam fraksi enzim:

Konsentrasi glukosa pada Fraksi 1

$$y = ax - b$$

$$x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \frac{0,065 - 0,1574}{1,236}$$

$$x = 0,1799 \text{ mg/m}$$

B. Aktivitas Enzim Selulase

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{C}{\text{Mr Glukosa}} \times \frac{Fp}{VE} \times \frac{VS}{t} \times 1000 \text{ } \mu\text{mol/mmol}$$

Aktivitas enzim selulase pada fraksi 1

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim} &= \frac{C}{\text{Mr Glukosa}} \times \frac{Fp}{VE} \times \frac{VS}{t} \times 1000 \text{ } \mu\text{mol/mmol} \\ &= \frac{0,1799 \text{ mg/mL}}{180 \text{ mg/mmol}} \times \frac{1}{1 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mL}}{30 \text{ menit}} \times 1000 \text{ } \mu\text{mol/mmol} \\ &= \frac{179,9 \text{ } \mu\text{mol}}{5400 \text{ mL.menit}} \\ &= 0,0333 \text{ } \mu\text{mol/mL.menit} \\ &= 0,0333 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
ALAUDDIN
M A K A S S A R

Lampiran 7: Perhitungan untuk Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Cara membuat larutan induk glukosa adalah

$$\frac{1 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} = \frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} = \frac{0,025 \text{ g}}{25 \text{ ml}}$$

untuk mebuat larutan standar 25 mg/mL dibutuhkan 0,025 g glukosa, dilarutkan dengan *water one* sebanyak 25 mL. Kemudian larutan glukosa dengan konsentrasi 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mg/mL sebanyak 5 mL. Dibuat sesuai dengan perhitungan menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut:

a. Konsentrasi 0,1 mg/mL

$$\begin{aligned} V_1.M_1 &= V_2.M_2 \\ V_1. 1 \text{ mg/mL} &= 5 \text{ mL}.0,1 \text{ mg/mL} \\ V_1 &= 0,5 \text{ mL larutan stok glukosa} + 4 \text{ mL } \textit{water one} \end{aligned}$$

b. Konsentrasi 0,2 mg/mL

$$\begin{aligned} V_1.M_1 &= V_2.M_2 \\ V_1. 1 \text{ mg/mL} &= 5 \text{ mL}.0,2 \text{ mg/mL} \\ V_1 &= 1 \text{ mL larutan stok glukosa} + 4 \text{ mL } \textit{water one} \end{aligned}$$

c. Konsentrasi 0,4 mg/mL

$$\begin{aligned} V_1.M_1 &= V_2.M_2 \\ V_1. 1 \text{ mg/mL} &= 5 \text{ mL}.0,4 \text{ mg/mL} \\ V_1 &= 1,5 \text{ mL larutan stok glukosa} + 3,5 \text{ mL } \textit{water one} \end{aligned}$$

d. Konsentrasi 0,6 mg/mL

$$\begin{aligned} V_1.M_1 &= V_2.M_2 \\ V_1. 1 \text{ mg/mL} &= 5 \text{ mL}.0,6 \text{ mg/mL} \\ V_1 &= 2 \text{ mL larutan stok glukosa} + 3 \text{ mL } \textit{water one} \end{aligned}$$

e. Konsentrasi 0,8 mg/mL

$$V_1.M_1 = V_2.M_2$$

$$V_1. 1 \text{ mg/mL} = 5 \text{ mL}.0,8 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ mL larutan stok glukosa} + 2,5 \text{ mL } \textit{water one}$$

f. Konsentrasi 1 mg/mL

$$V_1.M_1 = V_2.M_2$$

$$V_1. 1 \text{ mg/mL} = 5 \text{ mL}.1 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL larutan}$$

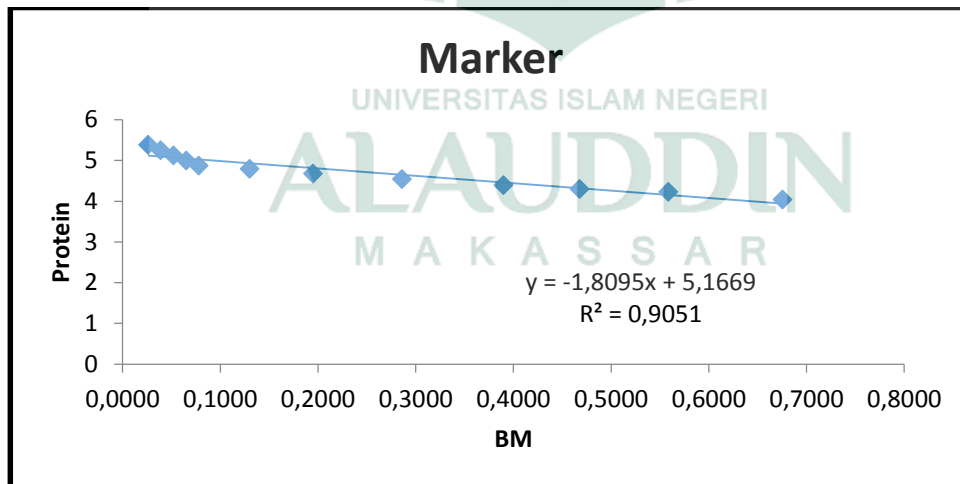


Lampiran 8: Penentuan Berat Molekul Protein

Tabel Hasil running elektroforesis Marker

Nama Protein	BM	Log BM	Run (cm)	Band (cm)	Rf
1	245000	5,389166	3,85	0,10	0,0260
2	180000	5,255273	3,85	0,15	0,0390
3	135000	5,130334	3,85	0,20	0,0519
4	100000	5	3,85	0,25	0,0649
5	75000	4,875061	3,85	0,30	0,0779
6	63000	4,799341	3,85	0,50	0,1299
7	48000	4,681241	3,85	0,75	0,1948
8	35000	4,544068	3,85	1,10	0,2857
9	25000	4,39794	3,85	1,50	0,3896
10	20000	4,30103	3,85	1,80	0,4675
11	17000	4,230449	3,85	2,15	0,5584
12	11000	4,041393	3,85	2,60	0,6753

Gambar 8.1 Grafik hasil running elektroforesis Marker.



Tabel 8.2 Hasil running elektroforesis sampel Endapan Ekstrak Kasar

Sample	Run	Band	Rf	a	b	Log BM	BM (inverse Log)	BMkD
1 Endapan (Ekstrak Kasar)	3,85	0,80	0,207792	1,809	5,166	4,790104	61674,25	61,67
	3,85	1,00	0,25974	1,809	5,166	4,69613	49674,08	49,67
	3,85	1,50	0,38961	1,809	5,166	4,461195	28919,77	28,92
	3,85	1,80	0,467532	1,809	5,166	4,320234	20904,21	20,90

Tabel 8.3 Hasil running elektroforesis sampel Endapan Fraksinasi 80%

Sample	Run	Band	Rf	a	b	Log BM	BM (inverse Log)	BMkD
6 Endapan (Fraksi nasi 80 %)	3,85	0,40	0,103896	1,809	5,166	4,978052	95071,85	95,07
	3,85	0,60	0,155844	1,809	5,166	4,884078	76573,4	76,57
	3,85	0,80	0,207792	1,809	5,166	4,790104	61674,25	61,67

Keterangan :

Run : Jarak keseluruhan yang didapat dari pengukuran stacking gel ke separating gel.

Band : Jarak yang didapat dari pengukuran stacking gel ke setiap noda pita protein yang tampak pada gel

Rf : hasil pembagian antara jarak Run dengan Band.

Log BM : hasil dari (nilai b*nilai Rf + nilai a)

BM : $10^{(\log BM)}$

BM Kd : nilai berat molekul protein dalam satuan KDa

Lampiran 9

Dokumentasi Penelitian

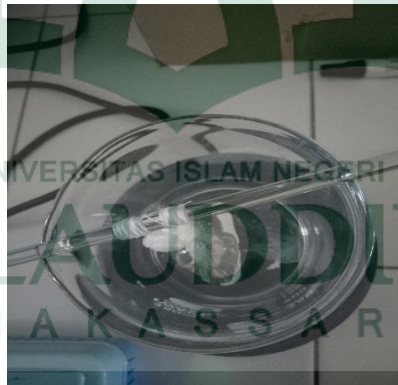
9.1 Dialisis Enzim Selulase



Hasil Fraksi 80%



Mengaduk dengan Menggunakan Magnetic Stirrer



Menambahkan BaCl_2

9.2 Kromatografi Filtrasi Gel



Menimbang Matriks Sephadex G-75



Memvacum Matriks Sephadex G-75



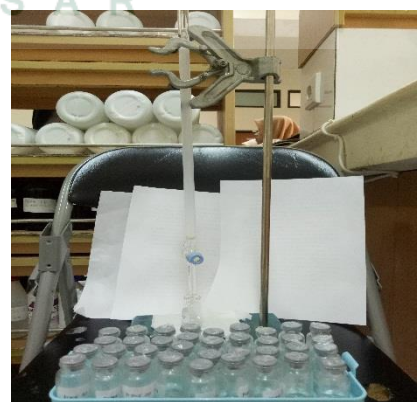
Memasukkan Sampel ke dalam kolom



Memasukkan Matriks Kedalam Kolom



Menampung Hasil Fraksi



Hasil fraksi

9.3 Pengujian Kadar Protein



Fraksi Enzim + Pereaksi Bardford



Pengujian Kadar Protein

9.4 Pengujian Aktivitas Enzim Selulase



Fraksi Enzim Selulase



Menambahkan pereaksi DNS



Mendinginkan



Memanaskan

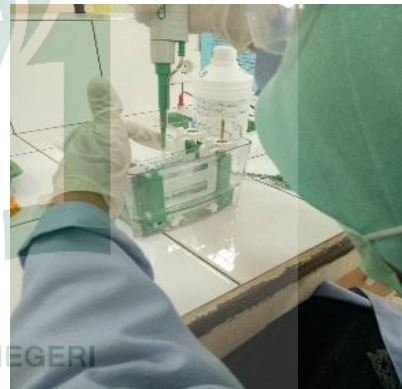


Pengujian Aktivitas Enzim Selulase

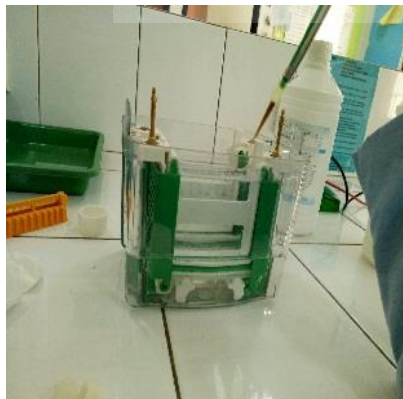
9.5 Elektroforesis Gel



Pembuatan Gel Pemisah



Pembuatan Gel Penahan



Memasukkan Sampel dalam Sumur Gel

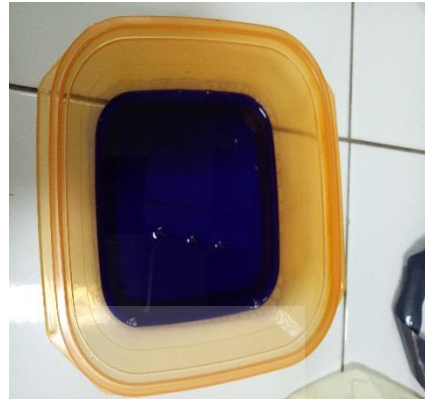


Preparasi Sampel

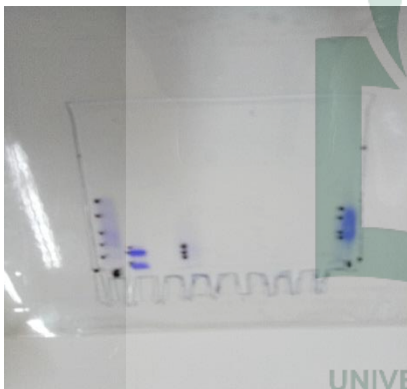




Running Elektroforesis



Pewarnaan Gel



Packing Gel



Pelunturan Warna Gel

RIWAYAT HIDUP PENULIS



Penulis bernama Kasmawati, sering disapa kasma atau Asma, lahir di Bantaeng Provinsi SUL-SEL. Pada tanggal 16 November 1996 dari pasangan bapak Saharuddin, dan ibu Suharni. Penulis merupakan anak pertama dari empat bersaudara.

Jenjang pendidikan penulis yaitu pada tahun 2007 lulus dari SDN Bawakaraeng II Makassar, kemudian melanjutkan sekolah di SMP Negeri 2 Bissappu Kab. Bantaeng dan lulus tahun 2010. Setelah itu sekolah di SMA Negeri 16 Makassar. Hingga akhirnya penulis memasuki salah satu Universitas di kota Makassar tepatnya di Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar, dan lulus di jurusan Kimia fakultas Sains dan Teknologi pada tahun 2013. Setelah hampir 4 tahun dengan gelar mahasiswa, penulis pernah aktif di salah satu organisasi, yaitu Himpunan Mahasiswa Jurusan (HMJ) Kimia dengan menjabat sebagai Bendahara Umum (BENDUM). Kemudian penulis berhasil menyelesaikan studinya dan meraih gelar Sarjana Sains (S.Si) pada tanggal 24 agustus 2017.